

International Publication No. WO 00/24416 A1

---

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Translation Company  
910 West Avenue, Austin, Texas 78701 USA

Code: 522-78167

INTERNATIONAL PATENT OFFICE  
WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY  
International Patent Published on the Basis of the Patent Cooperation Treaty  
INTERNATIONAL PUBLICATION NO. WO 00/24416 A1

International Patent Classification <sup>7</sup> :	A 61 K 38/19 47/36 A 61 P 19/08 3/00 //C 07 K 14/52
International Filing No.:	PCT/JP99/05963
International Filing Date:	October 28, 1999
International Publication Date:	May 4, 2000
Priority	
Date:	October 28, 1998
Country:	JP
No.:	Hei 10[1998]-322874
Designated States:	AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA, European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)

REMEDIES FOR METABOLIC BONE ERRORS

Applicants (For all designated countries except U.S.):	Snow Brand Milk Products Co., Ltd. 6-1-1 Naeho-cho, Higashi-ku, Sapporo City, Hokkaido
	Sankyo Co., Ltd. 1-2-58 Hiro-cho, Shinagawa-ku, Tokyo

## Inventors and Inventor/Applicants (U.S. only):

Shinichi Mochizuki  
5-22-6 Midori, Minami  
Kawauchi-cho, Kawauchi gun,  
Tochigi-ken

Nobuaki Fujise  
201 Ishibashi Heights, 223-2  
Ishibashi, Shimo Tsuga gun,  
Tochigi-ken

Chiharu Masuyama  
580-1 Ishibashi, Ishibashi-cho,  
Shimo Tsuga gun, Tochigi-ken

Eisuke Tsuda  
407 Building 5, Daiya Palace Jiji  
Medical College  
2-13-1 Gion, Minami Kawauchi-cho,  
Kawauchi gun, Tochigi-ken

Kanji Higashio  
1769-10 Yamada, Kawagoe City,  
Saitama

## Agent:

Seiya Fujino  
8F Mihamama Building  
1-2-1 Yotsuya, Shinjuku-ku, Tokyo

Attached documents are published with  
International search report

**Abstract**

Novel remedies for bone metabolic errors. These remedies comprise at least one member selected from the group consisting of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), analogs thereof and variants thereof and polysaccharides or derivatives thereof. As the polysaccharides or derivatives thereof, use may be made of heparin, dextran sulfate, etc. These remedies have excellent therapeutic effects on bone metabolic errors such as osteoporosis, hypercalcemia and rheumatoid arthritis and can sustain the activities over a long time, which makes them highly useful as drugs.

## FOR INFORMATION ONLY

Codes for the identification of PCT contract states on the cover sheets of the documents that publish the international applications in accordance with the PCT.

AE	United Arab Emirates	GW	Guinea-Bissau	RU	Russian Federation
AL	Albania	HR	Croatia	SD	Sudan
AM	Armenia	HU	Hungary	SE	Sweden
AT	Austria	ID	Indonesia	SG	Singapore
AU	Australia	IE	Ireland	SI	Slovenia
AZ	Azerbaijan	IL	Israel	SK	Slovakia
BA	Bosnia-Herzegovina	IN	India	SL	Sierra Leone
BB	Barbados	IS	Iceland	SN	Senegal
BE	Belgium	IT	Italy	SZ	Swaziland
BF	Burkina Faso	JP	Japan	TD	Chad
BG	Bulgaria	KE	Kenya	TG	Togo
BJ	Benin	KG	Kyrgyzstan	TJ	Tajikistan
BR	Brazil	KP	Democratic People's Republic of Korea	TM	Turkmenistan
BY	Belarus	KR	South Korea	TR	Turkey
CA	Canada	KZ	Kazakhstan	TT	Trinidad and Tobago
CF	Central African Republic	LC	Saint Lucia	TZ	Tanzania
CG	Congo	LI	Liechtenstein	UA	Ukraine
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	UG	Uganda
CI	Côte d'Ivoire	LR	Liberia	US	United States of America
CM	Cameroon	LS	Lesotho	UZ	Uzbekistan
CN	China	LT	Lithuania	VN	Vietnam
CR	Costa Rica	LU	Luxembourg	YU	Yugoslavia
CU	Cuba	LV	Latvia	ZA	South Africa
CY	Cyprus	MA	Morocco	ZW	Zimbabwe
CZ	Czech Republic	MC	Monaco		
DE	Germany	MD	Republic of Moldavia		
DK	Denmark	MG	Madagascar		
DM	Dominica	MK	Macedonia		
EE	Estonia	ML	Mali		
ES	Spain	MN	Mongolia		
FI	Finland	MR	Mauritania		
FR	France	MW	Malawi		
GA	Gabon	MX	Mexico		
GB	United Kingdom	NE	Niger		
GD	Grenada	NL	Netherlands		
GE	Georgia	NO	Norway		
GH	Ghana	NZ	New Zealand		
GM	Gambia	PL	Poland		
GN	Guinea	PT	Portugal		
GR	Greece	RO	Romania		

## Detailed explanation of the invention

### Technical field

This invention pertains to novel remedies for metabolic bone errors having high activity and long sustaining time. The remedies of this invention for metabolic bone errors have excellent therapeutic activity against metabolic bone diseases such as osteoporosis, hypercalcemia and rheumatoid arthritis, and are useful as drugs.

### Background technology

Bone not only provides support for the body, it is also the largest organ for storing calcium in the body, and 99% of the calcium in the body is stored in bone. Bone constantly undergoes two contradictory processes, namely resorption and formation of the bone, and plays an important role in maintaining a stable supply of serum calcium. It is known that when osteoclasts, which play an important role in the resorption of bone, are activated, excessive calcium is released from the bone into the blood and the steady state of calcium in the blood is disrupted, causing hypercalcemia. Hypercalcemia is a disease caused by bone metastasis with cancer, and the number of patients is expected to increase. Hence, development of treatment drugs is being expeditiously conducted. Currently, calcitonin and its derivatives as well as bisphosphonate compounds are being used as the treatment drugs for such hypercalcemia diseases. However, the therapeutic efficacy of these drugs is not satisfactory and new drugs which can replace them are desired.

On the other hand, it was reported that osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) (WO96/26217), known as a protein factor for suppressing differentiation of osteoclasts, showed activity of reducing serum calcium (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp. 382-387 (1998); Endocrinology, Vol. 139, pp. 4012-4015 (1998)). OCIF is expected to be an entirely new treatment drug for hypercalcemia. OCIF is a protein and can be metabolized rapidly in the body. Accordingly, development of an OCIF drug having good stability and high activity is desirable.

### Teaching of the invention

Focusing on the above aspects, the present inventors have vigorously conducted investigations, and as a result have discovered that the activity of OCIF against the diseases of metabolic bone disorders could be enhanced. Accordingly, the task of the present invention is to enhance the activity of OCIF against diseases of metabolic bone disorders as well as to provide drugs for treating metabolic bone disorders with sustaining efficacy.

The present invention pertains to treatment drugs for metabolic bone disorders comprising at least one substance selected from a group consisting of osteoclastogenesis

inhibitory factor (OCIF), analogs thereof and variants thereof, and polysaccharides and derivatives thereof.

In the present invention, it is preferred that the aforementioned polysaccharide is heparin and the aforementioned polysaccharide derivative is dextran sulfate.

According to the present invention, remedies having excellent and sustained activity against metabolic bone disorders such as osteoporosis, hypercalcemia and rheumatoid arthritis can be provided, and they are useful as drugs.

Furthermore, the present invention pertains to a method for enhancing the activity of osteoclastogenesis inhibitory factor by utilizing polysaccharides or derivatives thereof.

The OCIF utilized in the present invention can be a natural type or gene recombinant type such as those obtained by the methods described in WO 96/26217, but there are no restrictions as to their origin. However, the human type is particularly preferred. As examples of such natural or gene recombinant OCIF, there is the monomer type of molecular weight about 60 kDa or the dimer type of molecular weight about 120 kDa based on SDS-PAGE under nonreduction conditions.

Moreover, analogs or variants of OCIF may also be utilized in the present invention. One example is that an OCIF cDNA fragment obtained from a cDNA library prepared with poly (A)<sup>+</sup> RNA of an IMR-90 cell (ATCC CCL-186) is used as a probe and an OCIF analog cDNA obtained by hybridization is inserted into an expression vector, which is introduced into a normally used host and expressed in the host, followed by purifying by normal methods. To be more specific, OCIF2, OCIF3, OCIF4 and OCIF5 described in WO 96/26217 may be cited as the examples.

Among these substances, as described in WO 96/26217, OCIF2 has a deletion of 21 bp from the No. 265 guanine to the No. 285 guanine in the base sequence of the OCIF cDNA as well as a deletion of 7 amino acids for the amino acid sequence from the No. 68 glutamic acid (Glu) to the No. 74 glutamine (Gln) of the OCIF amino acid sequence.

In OCIF3, the No. 9 cytidine of the base sequence of the OCIF cDNA is converted to guanine, and for the amino acid sequence, the No. 19 asparagine (Asn) of the OCIF amino acid sequence is converted to lysine (Lys). However, in this regard, it is thought to be a substitution of the signal sequence and there is no effect on the secreted OCIF3. Additionally, there is a deletion of 117 bp in the OCIF cDNA from the No. 872 guanine to the No. 988 guanine in the base sequence of the OCIF cDNA, as well as a deletion of 39 amino acids for the amino acid sequence from the No. 270 threonine (Thr) to the No. 308 leucine (Leu) of the OCIF amino acid sequence.

In OCIF4, the No. 9 cytidine of the base sequence of the OCIF cDNA is converted to guanine, and for the amino acid sequence, the No. 19 asparagine (Asn) of the OCIF amino acid

sequence is converted to lysine (Lys). Moreover, the No. 22 guanine is converted to thymidine, and for the amino acid sequence, the No. 14 alanine (Ala) of the OCIF amino acid sequence is converted to serine (Ser). However, in this regard, it is thought to be a substitution of the signal sequence and there is no effect on the secreted OCIF4. Additionally, there is an insertion of about 4 kb intron 2 between the No. 400 and No. 401 base sequence of the OCIF cDNA in which open reading frame stops. There is also a new amino acid sequence of 21 amino acids added in the amino acid sequence after the No. 112 alanine (Ala) of the OCIF amino acid sequence.

In OCIF5, the No. 9 cytidine of the base sequence of the OCIF cDNA is converted to guanine, and for the amino acid sequence, the No. 19 asparagine (Asn) of the OCIF amino acid sequence is converted to lysine (Lys). However, in this regard, it is thought to be a substitution of the signal sequence and there is no effect on the secreted OCIF5. Additionally, there is an insertion of about 1.8 kb in the second half of intron 2 between the No. 400 and No. 401 base sequence of the OCIF cDNA in which open reading frame stops. There is also a new amino acid sequence of 12 amino acids added in the amino acid sequence after the No. 112 alanine (Ala) of the OCIF amino acid sequence.

As the examples of the variants, those having insertion, addition, substitution or deletion of one or more amino acids in the amino acid sequence of OCIF may be cited. More specifically, those obtained by preparing modified OCIF cDNA having substitution or deletion modification in the OCIF cDNA through splicing using PCR method or a restricted enzyme and inserting said cDNA into an expression vector and introducing the vector into a normally used host, followed by expression in the host and purification by a conventional method, may be cited.

The polysaccharides utilized in the present invention are the polymeric substances (glycane) formed from monosaccharides by glycoside bonding. It is preferred that they are heteropolysaccharides (heteroglycans) having two or more constituting monosaccharides. Specifically, as examples of natural polysaccharides, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, keratan sulfate, carrageenan, pectin and heparin, and as examples of synthetic polysaccharide derivatives, dextran sulfate, etc., can be utilized. The use of sulfated glycan is particularly preferred, and heparin having molecular weight of 3000-6000 and dextran sulfate having molecular weight of 5000-10,000 can be used. In the remedies of the present invention for metabolic bone disorders, it is preferred that one or more substances be selected from a group consisting of OCIF, analogs thereof and variants thereof and the polysaccharides and their derivatives are blended so that the ratio of the polysaccharides and analogs thereof to the OCIF, analogs thereof and variants thereof is 1-100 fold, and is particularly preferred at 1-16 fold. The drugs of the present invention obtained by blending one or more substances selected from a group consisting of OCIF, analogs thereof and variants thereof and polysaccharides and their derivatives are remedies for metabolic bone disorders.

having excellent therapeutic and sustaining effect compared to administration of OCIF alone, and are effective against metabolic bone disorders such as osteoporosis, hypercalcemia and rheumatoid arthritis.

The drug preparations of the present invention can be safely administered to humans or animals as drugs orally or nonorally. As examples of nonoral administration, intravenous injection, muscular injection, subcutaneous injection, transnasal administration, oral cavity administration and transmembrane administration may be cited. The drug preparations for these administration routes are prepared as drug compositions by known methods using pharmacologically acceptable carriers, excipients, lubricants and colorants as the drug components and administered. In the case of preparing injection preparations, in addition to OCIF and polysaccharides, pH adjusters, buffering agents, stabilizers and solubilizers are added if necessary to make injection preparations by normal methods. In such cases, conventional additives such as human serum albumin or surfactants may be optionally added. As examples of surfactants, polyanionic or anionic surfactants may be cited. The injection preparations may be filled in vials as solution preparations or made into freeze-dried preparations, which are dissolved in distilled water or physiological saline solution at suitable time when administering. When OCIF was administered to a normal rat at a dose of 3 or 24 mg/kg-day once per day continuously for 2 weeks by intravenous injection, increasing bone density and bone mass were observed, yet no histopathological abnormality was observed in 38 tissues and there were no changes of the blood counts (H. Yasuda et al.: Endocrinology, Vol. 139, pp. 1329-1337 (1998)). Thus, the effect of OCIF is highly specific and its safe application to humans can be expected.

There are no particular restrictions in regard to the dose and dosing method of the remedies of the present invention for metabolic bone disorders when administering to patients, and they depend on the conditions of the patients including degree of the disease, age, health condition and body weight. For example, it is suitably administered at about 0.01-1 mg/kg per day nonorally by one dose or several doses a day. Also, the activity of the drug of the present invention can be determined from the serum calcium concentration. For example, OCIF solution prepared with a suitable solvent and with added polysaccharides is administered intravenously into rats, and the blood is sampled over time to determine the serum calcium by conventional methods.

Furthermore, the present invention pertains to a method for increasing the activity of osteoclastogenesis inhibitory factor by using polysaccharides or derivatives thereof. According to the present invention, the blood concentration of blood OCIF can be increased and the reduction effect of OCIF on the serum calcium concentration can be enhanced.

### Brief description of the figures

Figure 1 shows the serum calcium concentration 3 h after administration in Application Example 2 for a preparation in which polysaccharides are added to OCIF.

#### Explanation of symbols

- D-1: OCIF 0.5 mg/kg + dextran sulfate (molecular weight 5000) 2 mg/kg
- D-2: OCIF 0.5 mg/kg + dextran sulfate (molecular weight 8000) 2 mg/kg
- D-3: OCIF 0.5 mg/kg + dextran sulfate (molecular weight 10,000) 2 mg/kg
- H-1: OCIF 0.5 mg/kg + heparin (207.8 units/mg) 2 mg/kg
- H-2: OCIF 0.5 mg/kg + heparin (171.2 units/mg) 2 mg/kg
- H-3: OCIF 0.5 mg/kg + heparin (molecular weight 3000) 2 mg/kg
- H-4: OCIF 0.5 mg/kg + heparin (molecular weight 6000) 2 mg/kg

\*\* Significant difference with a risk level of 1% or below.

Figure 2 shows the serum calcium concentration 3 h after administration in Application Example 3 when the mixing ratio of OCIF and polysaccharides are varied.

#### Explanation of symbols

\*\* Significant difference with a risk level of 1% or below.

Figure 3 shows the serum calcium concentrations 3, 6 and 9 h after administration, respectively, in Application Example 4 when a preparation in which polysaccharides are added to OCIF is administered.

#### Explanation of symbols

\*\* Significant difference with a risk level of 1% or below.

Figure 4 shows the change of blood OCIF concentrations over time in Application Example 5 when a preparation in which polysaccharides are added to OCIF is administered.

#### Explanation of symbols

- A: Graph showing the blood concentration of dimeric OCIF.
- B: Graph showing the blood concentration of monomeric OCIF.
- : OCIF
- : OCIF + dextran sulfate

Figure 5 shows the change of the ratio of blood dimeric/monomeric OCIF concentrations over time in Application Example 5 when a preparation in which polysaccharides are added to OCIF is administered.

### Explanation of symbols

- A: OCIF
- B: OCIF + dextran sulfate
- O: Dimeric OCIF
- Δ: Monomeric OCIF

Figure 6 shows the blood OCIF concentrations 2 and 4 h after administration in Application Example 6 for preparations in which polysaccharides (dextran sulfate, apple pectin or citrus skin pectin) are added to OCIF.

### Explanation of symbols

- : 0.5 mg/kg OCIF alone
- ◊: 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% dextran sulfate
- : 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% apple pectin
- Δ: 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% citrus skin pectin

Figure 7 shows the blood OCIF concentrations 2 and 4 h after administration in application Example 6 for preparations in which polysaccharides (dextran sulfate, apple pectin or carrageenan) are added to OCIF.

### Explanation of symbols

- : Single dose of 0.5 mg/kg OCIF
- ◊: 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% dextran sulfate
- : 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% apple pectin
- Δ: 0.5 mg/kg OCIF + 0.5% carrageenan (lambda)

Figure 8 shows the blood OCIF concentrations after intravenous injection in Application Example 7 for preparations in which polysaccharides (dextran sulfate or apple pectin) are added to OCIF.

### Explanation of symbols

- : 50 µg/kg OCIF alone
- Δ: 50 µg/kg OCIF + 0.1% dextran sulfate
- : 50 µg/kg OCIF + 0.5% apple pectin

Figure 9 shows the blood OCIF concentrations after muscular injection in Application Example 7 for preparations in which polysaccharides (dextran sulfate or apple pectin) are added to OCIF.

### Explanation of symbols

○: 1 mg/kg OCIF alone

Δ: 1 mg/kg OCIF + 0.1% dextran sulfate

□: 1 mg/kg OCIF + 0.15% apple pectin

Figure 10 shows the blood calcium concentration 4 h after administration in Application Example 8 for preparations in which polysaccharides (apple pectin) are added to OCIF.

### The best form of practicing the invention

#### Application examples

The present invention is explained in detail by the following application examples. These are just specific examples and they are not to be construed as limiting the embodiment of the present invention in any way.

#### Application Example 1

##### Production of injection preparation - 1

500 µg obtained by following the method described in WO 96/26217 and 2 mg heparin were dissolved in 5 mL 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.15M sodium chloride and 0.01% Tween 80, and the solution was sterilized using a 0.22 µm sterilizing filter (Millex GV, Millipore Co.), followed by filling in vials to give an intravenous injection preparation.

##### Production of injection preparation - 2

500 µg human OCIF obtained by following the method described in WO 96/26217 and 2 mg dextran sulfate were dissolved in 5 mL 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.15M sodium chloride and 0.1% Tween 80, and the solution was sterilized using a 0.22 µm sterilizing filter (Millex GV, Millipore Co.), followed by filling in vials to give an intravenous injection preparation.

#### Application Example 2

##### Reduction effect of OCIF on serum calcium concentration by addition of polysaccharide - 1

2 mg dextran sulfate (molecular weight 8000 or 10,000: Sigma Co., and molecular weight 5000 or 50000: Wako Junyaku Co.) or heparin (207.8 or 171.2 units/mg: Wako Junyaku Co., and molecular weight 3000 or 6000: Sigma Co.) were dissolved in 2 mL 0.25 mg/mL human OCIF solution prepared by dissolving human OCIF (dimeric) (gene recombinant OCIF obtained by following the method described in WO 96/26217) in a 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) (hereafter, called the solvent) containing 0.15M NaCl and 0.01% Tween 80, followed

by standing overnight at 4°C. Also, 0.25- and 2.5-mg/mL solutions human OCIF and the solvent were also allowed to stand overnight at 4°C. These test sample solutions were prepared for the OCIF and dextran sulfate administering group (D groups), OCIF and heparin administering group (H groups) (for D groups and H groups, the dose of OCIF was 0.5 mg/kg), OCIF alone administering groups (OCIF doses were 0.5 mg/kg and 5 mg/kg), and the solvent group, respectively. A single intravenous injection was performed on 4-week-old female Wistar rats at a dose of 2 mL/kg. Blood sampling from the eye cavity was performed 3 h after the administration and serum was prepared. The calcium concentration of the obtained serum was then determined using a calcium C test (Wako Junyaku Co.). Figure 1 shows the results. From the results, it was found that there was a significant enhancing effect on the reduction of serum calcium concentration by administering 0.5 mg/kg OCIF with added dextran sulfate or heparin. Hence, it was confirmed that the reduction effect of human OCIF on serum calcium concentration was enhanced by adding polysaccharides.

### Application Example 3

#### Enhancing effect of the addition of polysaccharides on the activity of OCIF

2 mL dextran sulfate (molecular weight 5000: Wako Junyaku Co.) were dissolved in 2 mL 0.25 mg/mL human OCIF solution prepared in the same manner as in Application Example 2 at 1-, 2-, 4-, 8- and 16-fold by weight based on the human OCIF, followed by standing overnight at 4°C. Similarly, heparin (207.8 units/mg: Wako Junyaku Co.) was dissolved in 0.25 mg/mL human OCIF solution at the same ratio, followed by standing overnight at 4°C.

Furthermore, dextran sulfate or heparin solutions prepared at 4 mg/mL, human OCIF solutions prepared at 0.25 and 2.5 mg/mL and the solvent were also allowed to stand overnight at 4°C. Single intravenous injection of these test sample solutions was performed on 4-week-old female Wistar rats at a dose of 2 mL/kg, respectively. Blood sampling from the eye cavity was performed 3 h after the administration and serum was prepared. The calcium concentration of the obtained serum was then determined using a calcium C test (Wako Junyaku Co.). This test kit is a chelate method (ortho-cresolphthalein complexon (OCPC) method), in which 8-quinolinol is added to eliminate the effect of magnesium and increase the specificity. Under alkaline conditions, it binds with OCPC to give a purplish-red color, and by determining the absorbance, the calcium concentration can be determined. Figure 2 shows the results. From the results, it was found that there was a significant reduction effect on the serum calcium concentration when dextran sulfate was added at a 4-fold amount based on human OCIF. Also, it was found that there was a significant reduction effect on the serum calcium concentration when heparin was added at an equal amount or more based on human OCIF. Hence, it was confirmed that the

reduction effect of human OCIF on serum calcium concentration was enhanced by simultaneously administering human OCIF and polysaccharides at given ratios.

#### Application Example 4

##### Enhancing effect of the addition of polysaccharides on maintaining the activity of OCIF

20 mg dextran sulfate (molecular weight 5000: Wako Junyaku Co.) were dissolved in 2 mL 2.5 mg/mL human OCIF solution prepared with a solvent, followed by standing overnight at 4°C. Heparin 20 mg (207.8 units/mg: Wako Junyaku Co.) was dissolved in 0.25 mg/mL human OCIF solution 2 mL prepared with a solvent, followed by standing overnight at 4°C in the same manner. Moreover, human OCIF prepared at 2.5 mg/mL and the solvent are also allowed to stand overnight at 4°C. Single intravenous injection of the obtained test sample solutions was performed on 4-week-old female Wistar rats at a dose of 2 mL/kg, respectively (5 mg/kg as the amount of OCIF). Blood sampling from the eye cavity was performed 3, 6 and 9 h after the administration and a serum was prepared. The calcium concentration of the obtained serum was then determined using a calcium C test (Wako Junyaku Co.). Figure 3 shows the results. The results showed that there was significant reduction of the serum calcium concentration 3 h after the administration for the administering group of 5 mg/kg human OCIF alone, while there was no reduction effect on the serum calcium concentration 6 and 9 h after the administration.

On the other hand, it was found that there was significant reduction effect on the serum calcium concentration 9 h after the administration of the 2.5 mg/kg human OCIF solution added with 4-fold amount of dextran sulfate or heparin based on the human OCIF. Hence, it was confirmed that the sustained activity was enhanced by simultaneously administering human OCIF and polysaccharides.

#### Application Example 5

##### Effect of the maintaining the blood OCIF concentration by adding polysaccharides - 1

4 mg dextran sulfate were dissolved in 1 mL 1 mg/mL human OCIF solution prepared in the same manner as in Application Example 2, followed by standing overnight at 4°C. Single intravenous injection of the obtained test sample solution was performed on 9-week-old male Wistar rats at a dose of 1 mL/kg. Blood sampling from the eye cavity was performed 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720 and 1440 min after the administration and serum was prepared. The human OCIF concentration of the obtained serum was then determined using monoclonal antibodies recognizing dimeric OCIF, and monoclonal antibodies recognizing monomeric OCIF (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH

COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp. 382-387 (1998)) by the ELISA method described in

WO 96/26217. The total OCIF concentration was obtained as the sum of the dimeric OCIF concentration and the monomeric OCIF concentration. Figures 4 and 5 show the results. The results showed that the high blood OCIF concentration was obviously maintained in the group which was administered human OCIF solution containing 4-fold amount of dextran sulfate based on human OCIF, compared to the group which was administered 500 µg/kg human OCIF alone (Figure 4). Also, it was confirmed that conversion of dimeric OCIF to monomeric OCIF in the blood was inhibited (Figure 5). Accordingly, the blood OCIF concentration, particularly the blood concentration of the dimeric OCIF (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp. 382-387 (1998)) having a high activity of reduction of serum calcium concentration can be maintained.

#### Application Example 6

##### Effect of the maintaining the blood OCIF concentration by adding polysaccharides - 2

0.5% solution dextran sulfate, apple pectin or citrus pectin (all products of Wako Junyaku Co.) (solvent: 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.15M NaCl, 0.01% polysorbate 80) was mixed in 2 mL 0.25 mg/mL human OCIF solution prepared in the same manner as in Application Example 2 at equal amounts, followed by standing at room temperature for 4 h, to prepare test sample solutions. Additionally, as a control, 0.25 mg/mL OCIF solution (2 mL) was mixed with the solvent in the same way, followed by standing at room temperature for 4 h. Single intravenous injection of the test sample solutions was performed on 4-week-old male Wistar rats at a dose of 2 mL/kg, respectively. Blood sampling from the eye cavity was performed under ether anesthesia 2 and 4 h after the administration, and a serum was prepared. The human OCIF concentration of the obtained serum was then determined using the ELISA method described in WO 96/26217. Figure 6 shows the results.

Additionally, using the same method as mentioned previously, 0.5% solution dextran sulfate, apple pectin or carrageenan (lambda) (all products of Wako Junyaku Co.) was mixed in 2 mL 0.25 mg/mL human OCIF solution 2 at equal amounts, followed by standing at room temperature for 4 h, to prepare a test sample solution. Additionally, as a control, 0.25 mg/mL OCIF solution was mixed with an equal amount of the solvent in the same way, followed by standing at room temperature for 4 h. Single intravenous injection of the test sample solutions was performed on 4-week-old male Wistar rats at a dose of 2 mL/kg, respectively. Blood sampling from the eye cavity was performed under ether anesthesia 2 and 4 h after the administration, and a serum was prepared. The human OCIF concentration of the obtained serum was then determined using the ELISA method described in WO 96/26217. Figure 7 shows the results.

The results showed that the high blood OCIF concentration was obviously maintained in the groups which were administered test samples containing either dextran sulfate, apple pectin or citrus pectin, compared to the group which was administered human OCIF solution alone (Figure 6). Also, it was found in the group which was administered a test sample containing carrageenan that high blood OCIF concentration was obviously maintained (Figure 7). Hence, it was confirmed that the blood OCIF concentration was maintained by adding these polysaccharides.

#### Application Example 7

##### Effect of maintaining the blood OCIF concentration by adding polysaccharides - 3

Effect of maintaining blood OCIF concentration due to different administration routes was investigated using dextran sulfate or apple pectin (Wako Junyaky Co.) as the polysaccharide. Human OCIF was diluted with a solvent (10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.15M NaCl and 0.01% polysorbate 80) to prepare 50- $\mu$ g/mL OCIF solution for intravenous injection or 1000- $\mu$ g/mL solution for muscular injection. The aforementioned polysaccharides were then added to them to prepare respective test sample solutions. Dextran sulfate was added at 0.1% each in the OCIF solutions for intravenous injection and muscular injection. Apple pectin was dissolved in the solvent to prepare a 3-mg/mL solution, which was then mixed with a 2-fold amount of the OCIF solutions for intravenous injection or muscular injection (containing 100  $\mu$ g/mL and 2000  $\mu$ g/mL OCIF respectively). A single dose of 1 mL/kg of the respective solution was administered to 4-week-old Wistar rats. Blood sampling from the eye cavity was performed under ether anesthesia 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, and 360 min after the intravenous injection and 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 24 h after the muscular injection and serum was prepared. The human OCIF concentration of the obtained serum was then determined using the ELISA method described in WO 96/26217.

Figures 8 and 9 show the results.

The results showed that the high blood OCIF concentration was obviously maintained with the OCIF solutions containing either dextran sulfate or apple pectin for intravenous injection (Figure 8) or muscular injection (Figure 9). Hence, it was confirmed that the blood OCIF concentration was maintained by adding these polysaccharides, and that the sustaining effect on the blood OCIF concentration was observed independent of the administration route.

#### Application Example 8

##### Reduction effect of OCIF on serum calcium concentration by polysaccharide addition - 2

0.5% apple pectin (product of Wako Junyaku Co.) solution (solvent: 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 0.15M NaCl, 0.01% polysorbate 80) was mixed

into 2 mL 0.25 mg/mL human OCIF solution prepared in the same manner as in Application Example 2 at equal amounts, followed by standing at room temperature for 4 h, to prepare a test sample solution. Also, OCIF solution (0.25 mg/mL human OCIF solution, 2 mL) was mixed with an equal amount of the solvent and the solvent alone was prepared. Single intravenous injections of the test sample solutions were performed on 4-week-old male Wistar rats at a dose of 2 mL/kg respectively. Blood sampling from the eye cavity was performed under ether anesthesia 4 h after the administration, and a serum was prepared. The calcium concentration of the obtained serum was then determined using a calcium C test (Wako Junyaku Co.). Figure 10 shows the results. The results show that there was significant reduction of the serum calcium concentration for the group which was administered 0.5 mg/kg human OCIF containing apple pectin, while there was no reduction effect on the serum calcium concentration for the group which was administered 0.5 mg/kg human OCIF solution alone. Hence, it was confirmed that the reduction effect of human OCIF on serum calcium concentration can be enhanced by the addition of polysaccharides.

#### Possible industrial application

According to the present invention, remedies for metabolic bone disorders consisting of at least one substance selected from osteoclastogenesis inhibitory factor, analogs thereof or variants thereof and polysaccharides or derivatives thereof can be provided. According to the present invention, remedies for metabolic bone disorders having therapeutic efficacy for metabolic bone diseases such as osteoporosis, hypercalcemia, rheumatoid arthritis while capable of sustaining the activity can be provided and are useful as drugs.

#### Claims

1. Remedies for metabolic bone disorders comprising at least one substance selected from a group consisting of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), analogs thereof or variants thereof, and polysaccharides or derivatives thereof.
2. Remedies for metabolic bone disorders according to the description of Claim 1, where the OCIF is human OCIF.
3. Remedies for metabolic bone disorders according to the description of Claim 1, where the polysaccharides are heparin, pectin, and/or carrageenan.
4. Remedies for metabolic bone disorders according to the description of Claim 1, where the polysaccharide is dextran sulfate.
5. A method for improving the activity of osteoclastogenesis inhibitory factor using polysaccharides or derivatives thereof.

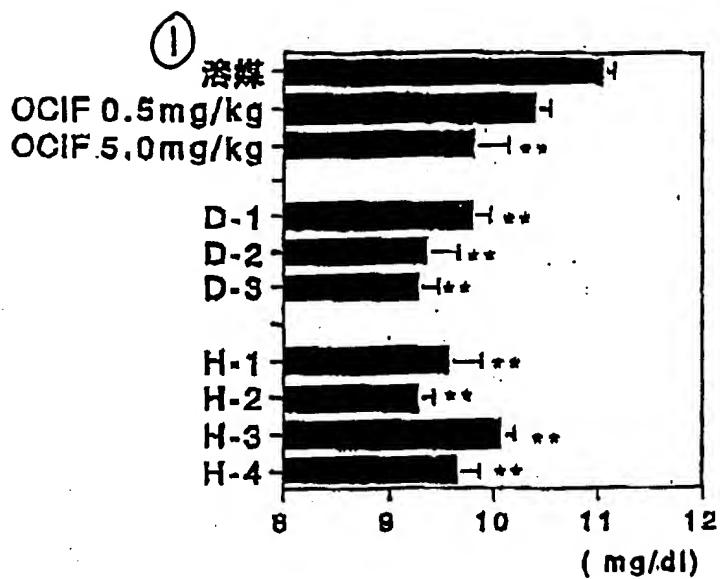


Figure 1

Key: 1 Solvent

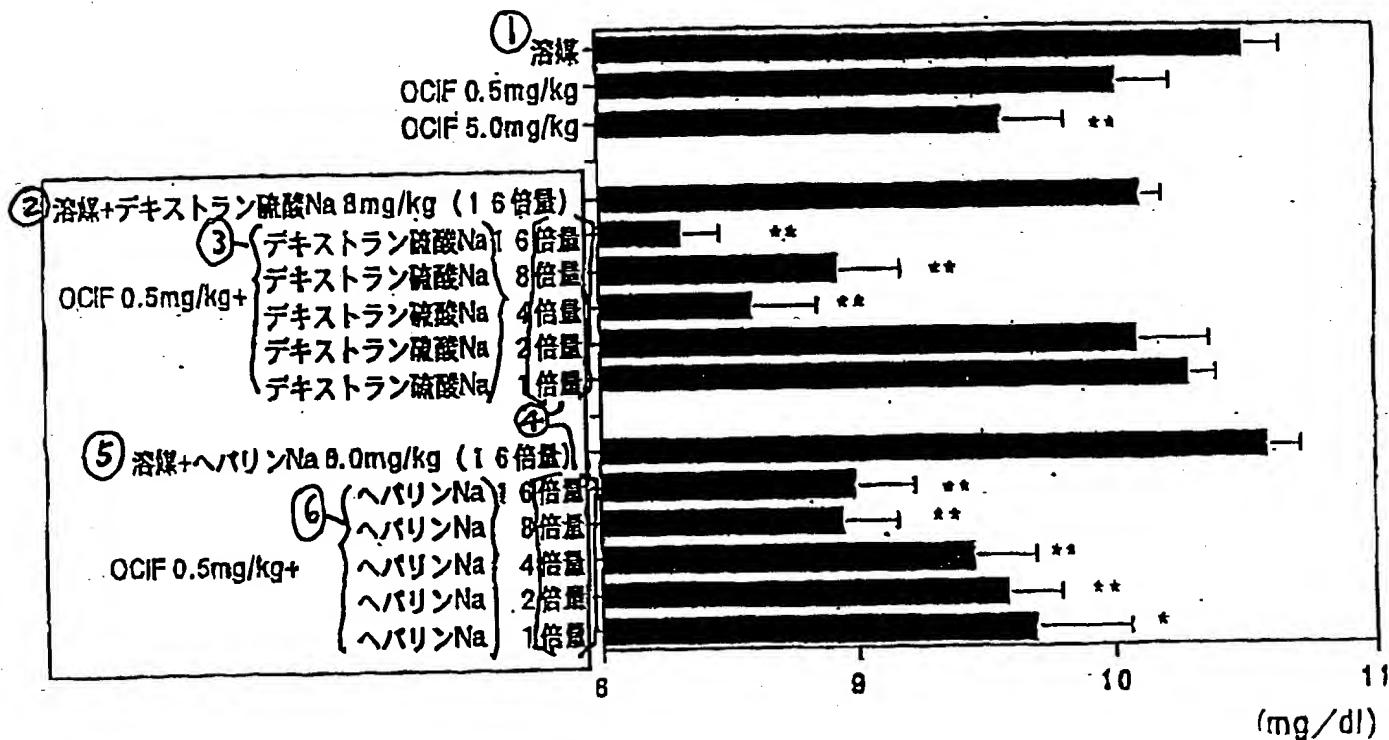


Figure 2

Key: 1 Solvent

2 Solvent + sodium dextran sulfate 8 mg/kg (16-fold amount)

3 Sodium dextran sulfate  
 4 -fold amount  
 5 Solvent + sodium heparin 8 mg/kg (16-fold amount)  
 6 Sodium heparin

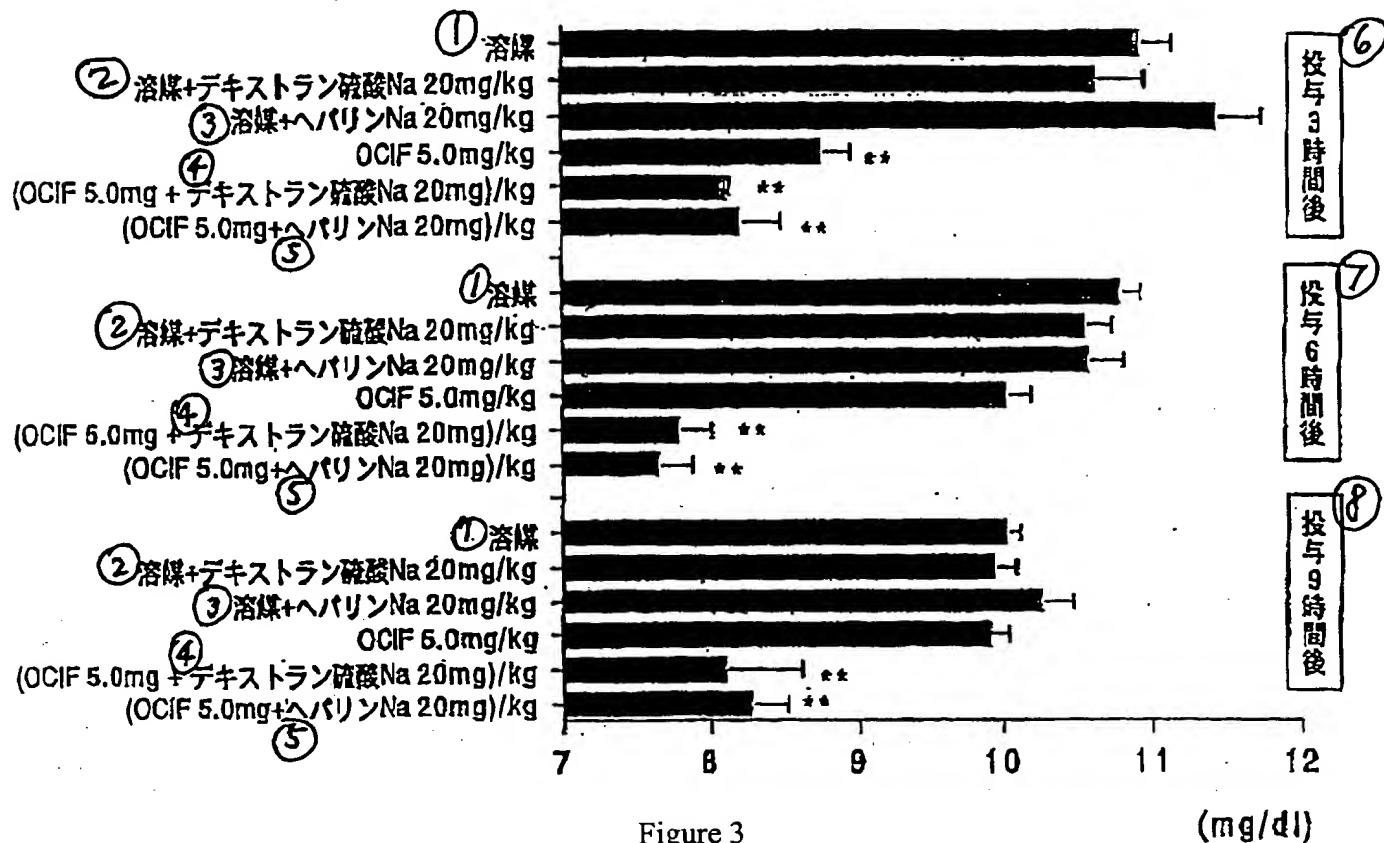


Figure 3

Key: 1 Solvent  
 2 Solvent + sodium dextran sulfate  
 3 Solvent + sodium heparin  
 4 Sodium dextran sulfate  
 5 Sodium heparin  
 6 3 h after administration  
 7 6 h after administration  
 8 9 h after administration

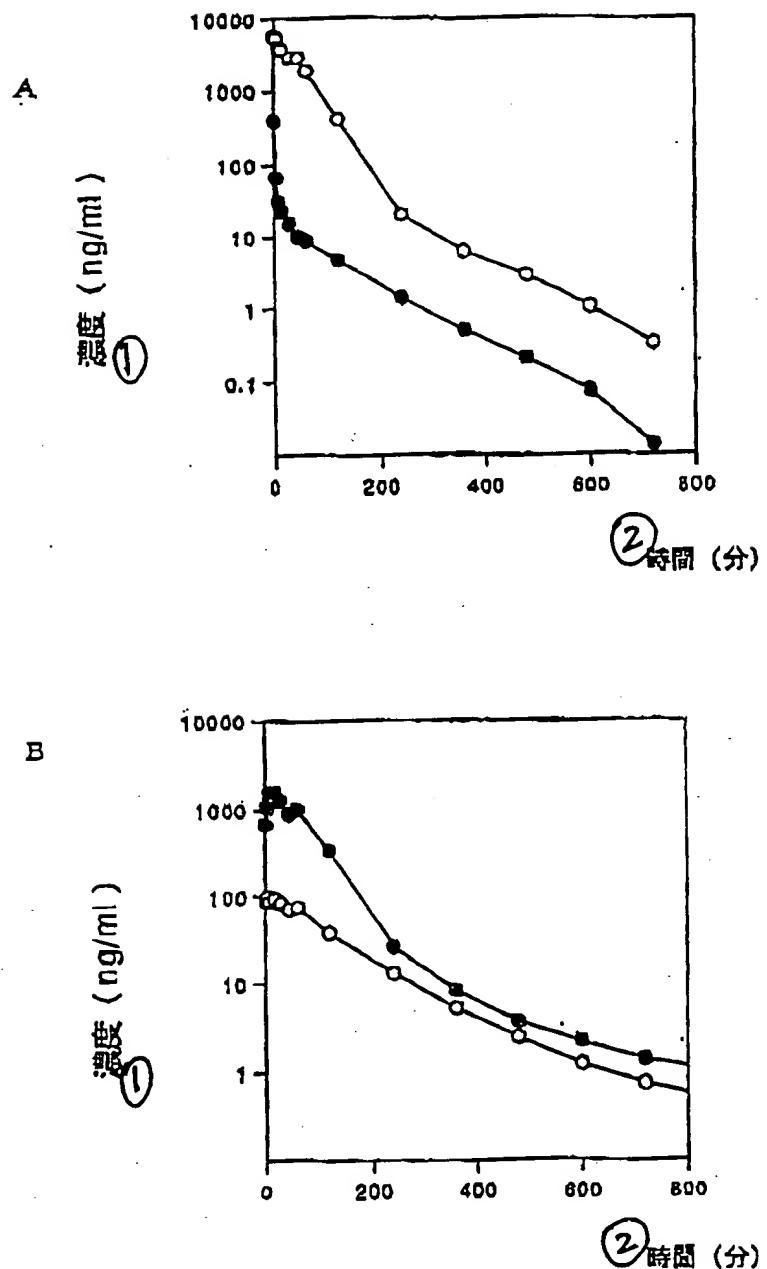


Figure 4

Key: 1 Concentration  
 2 Time (min)

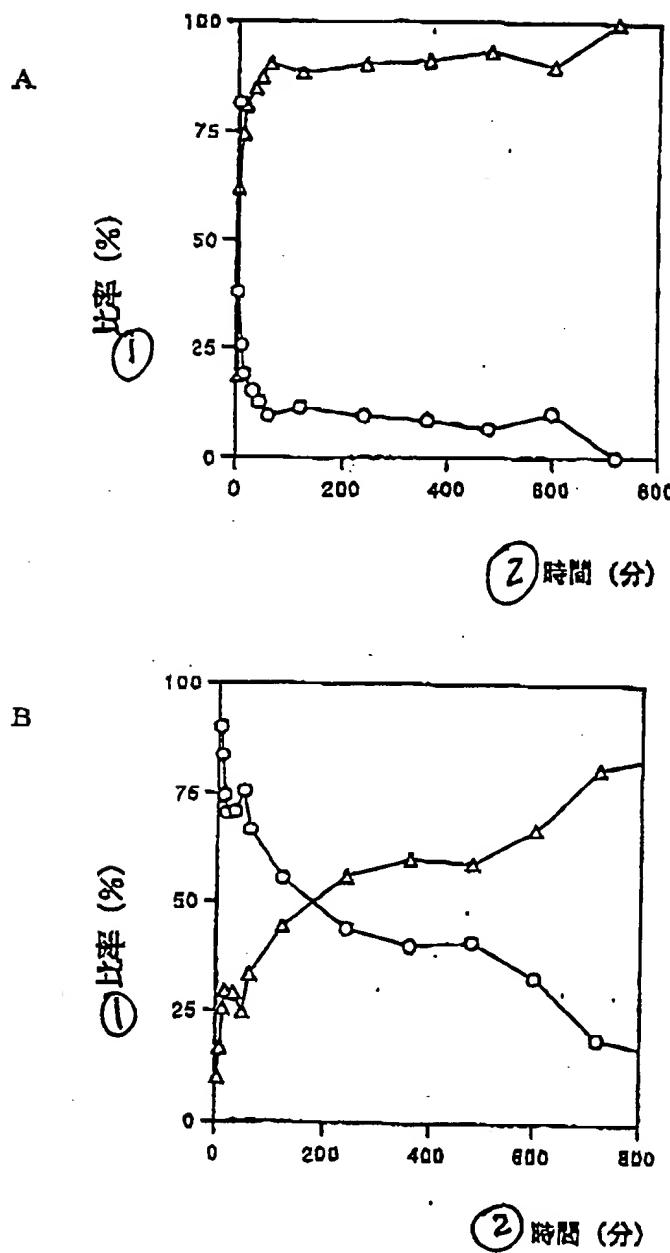


Figure 5

Key: 1 Rate  
2 Time (min)

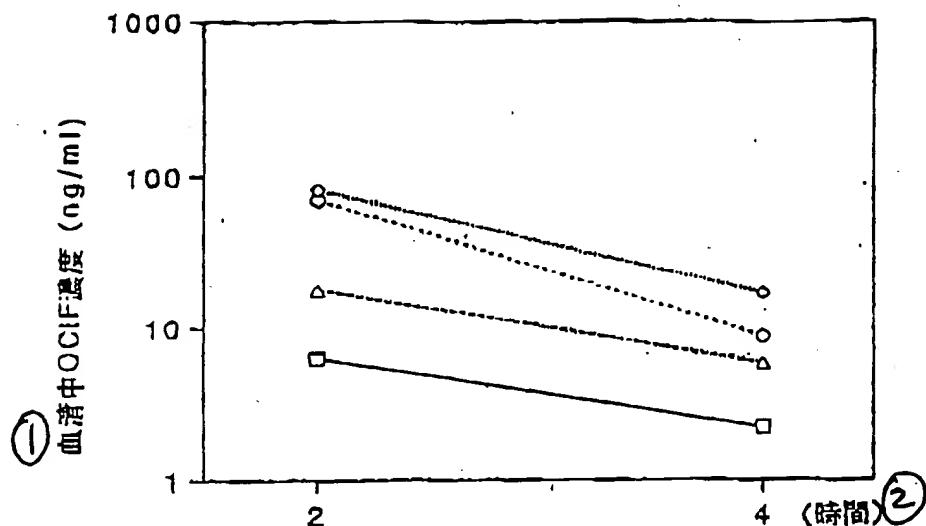


Figure 6

Key: 1 Serum OCIF concentration  
2 Hour

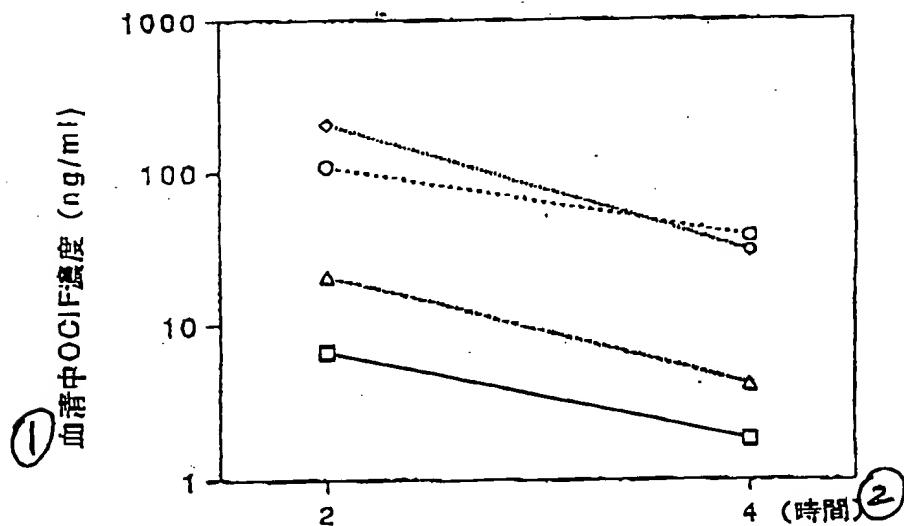


Figure 7

Key: 1 Serum OCIF concentration  
2 Hours

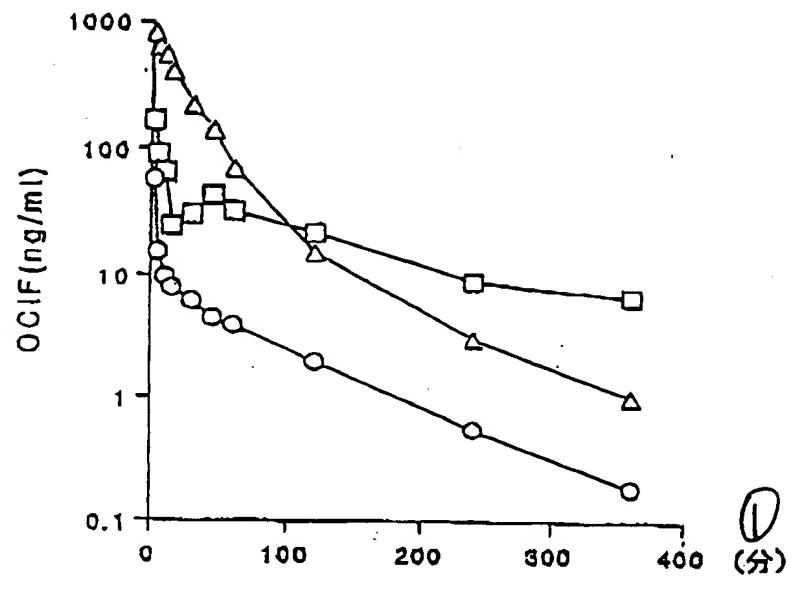


Figure 8

Key: 1 Min

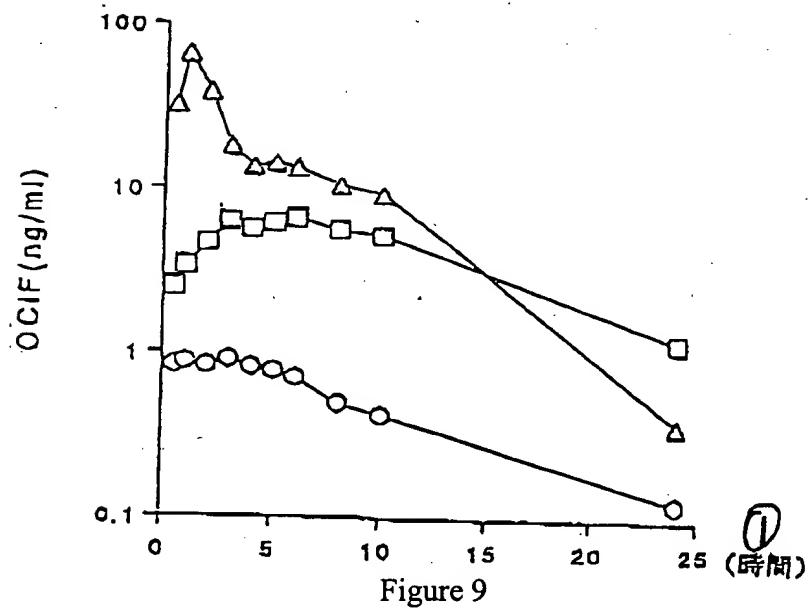


Figure 9

Key: 1 Hours

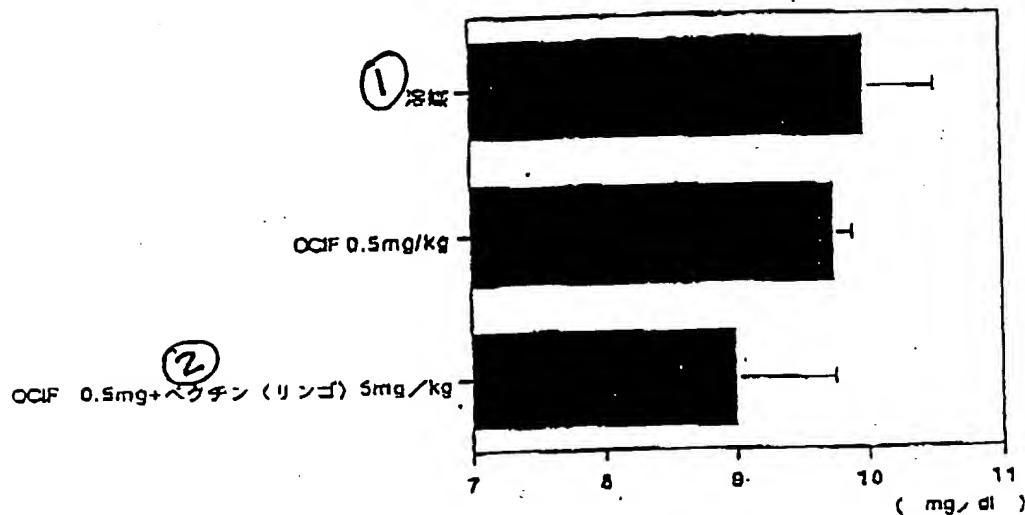


Figure 10

Key: 1 Solvent  
2 Pectin (apple)

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 38/19, 47/36, A61P 19/08, 3/00 // C07K 14/52		A1	(11) 国際公開番号 WO00/24416
			(43) 国際公開日 2000年5月4日(04.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05963			増山千春(MASUYAMA, Chiharu)[JP/JP]
(22) 国際出願日 1999年10月28日(28.10.99)			〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋580-1 Tochigi, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10-322874	1998年10月28日(28.10.98)	JP	津田英資(TSUDA, Eisuke)[JP/JP] 〒329-0434 栃木県河内郡南河内町祇園2-13-1 ダイヤパレス自治医大5番館407 Tochigi, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP]			東尾侃二(HIGASHIO, Kanji)[JP/JP] 〒350-0822 埼玉県川越市山田1769-10 Saitama, (JP)
〒065-0043 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP)			(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号
三共株式会社(SANKYO CO., LTD.)[JP/JP]			三浜ビル8階 Tokyo, (JP)
〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者: および			
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 望月伸一(MOCHIZUKI, Shinichi)[JP/JP]			(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
〒329-0433 栃木県河内郡南河内町緑5丁目22番6号 Tochigi, (JP)			添付公開書類 国際調査報告書
藤瀬暢彰(FUJISE, Nobuaki)[JP/JP]			
〒329-0511 栃木県下都賀郡石橋町石橋223-2 石橋ハイツ201 Tochigi, (JP)			

(54)Title: REMEDIES FOR BONE METABOLIC ERRORS

(54)発明の名称 骨代謝異常症治療剤

## (57) Abstract

Novel remedies for bone metabolic errors. These remedies comprise at least one member selected from the group consisting of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), analogs thereof and variants thereof and polysaccharides or derivatives thereof. As the polysaccharides or derivatives thereof, use may be made of heparin, dextran sulfate, etc. These remedies have excellent therapeutic effects on bone metabolic errors such as osteoporosis, hypercalcemia and rheumatoid arthritis and can sustain the activities over a long time, which makes them highly useful as drugs.

新規な骨代謝異常症治療剤を提供する。

破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF) 、その類縁体、またはその変異体からなる群から選択される一以上の物質と多糖類またはその誘導体とからなる骨代謝異常症治療剤。多糖類またはその誘導体としては、ヘパリン、デキストラン硫酸等が用いられる。

骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた治療効果を有し、その活性を長時間維持できる骨代謝異常症治療剤が提供される。医薬として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロバキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スウェーデン
BF ブルガリア・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドバ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサオ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダッド・トバゴ
CG コンゴー	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴィエトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴースラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

## 明細書

## 骨代謝異常症治療剤

技術分野

本発明は、活性及びその持続性が高い新規な骨代謝異常症治療剤に関する。本発明の骨代謝異常症治療剤は、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた治療活性を有し、医薬として有用である。

背景技術

骨は身体の支持能力だけでなく、生体内カルシウムの最大の貯蔵臓器として機能しており、生体に存在するカルシウムの99%は骨に蓄積されている。しかも、骨は絶えず骨吸収と骨形成という相反する作用を常に受けており、血清カルシウムの恒常性を保つ上で重要な役割を担っている。骨吸収において重要な役割を担っている破骨細胞が活性化されると、骨から過剰なカルシウムが血液中に流出し、血液中のカルシウムの恒常性が崩壊し、高カルシウム血症をきたすことが知られている。高カルシウム血症は癌の骨転移等により発症する疾患で、患者数の増加が予想され、その治療剤の開発が急がれている。現在、このような高カルシウム血症治療剤として、カルシトニン及びその誘導体、あるいはビスホスホネート系化合物が使用されている。しかし、これらの治療効果は満足できるものではなく、これらに代わる新規薬剤の開発が望まれている。

一方、破骨細胞の分化を抑制する蛋白性因子として知られている破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF) (WO96/26217号公報)が、血清カルシウム低下作用を有することが報告されている (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp382-387(1998); Endocrinology, Vol. 139, pp4012-4015(1998))。OCIFは、全く新しい高カルシウム血症治療剤として期待できるが、OCIFは蛋白質であるため生体内で速やかに代謝される。

そこで、より安定で作用の強いOCIFの製剤の開発が望まれていた。

#### 発明の開示

本発明者らは、上述の状況に鑑み鋭意研究の結果、OCIFに多糖類を加えて製剤化することにより、OCIFの有する骨代謝異常症に対する効果をさらに増強できることを見出した。従って本発明の課題は、骨代謝異常症に対するOCIFの効果をさらに増強し、その効果を持続せしめた骨代謝異常症治療剤を提供することにある。

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF)、その類縁体、またはその変異体からなる群から選択される一以上の物質と多糖類またはその誘導体とからなる骨代謝異常症治療剤に関する。

本発明において前記多糖類としてヘパリン、また前記多糖類誘導体としてデキストラン硫酸が好ましい。

本発明により、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた活性とその持続性とを有する治療剤が提供され、医薬として有用である。

また、本発明は多糖類またはその誘導体を用いることにより破骨細胞形成抑制因子の活性を高める方法に関する。

本発明で用いるOCIFは、例えばW096/26217号公報に記載された方法により得られる天然型あるいは遺伝子組み換え型のものであり、その由来は特に限定されないが、特に好ましくはヒト型のものである。このような天然型あるいは遺伝子組み換え型OCIFとしては、非還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kDaのモノマー型、あるいは分子量が約120kDaのダイマー型のものがある。

また、本発明ではOCIFの類縁体あるいは変異体を用いても良い。類縁体としては、IMR-90細胞 (ATCC CCL-186) のポリ (A)<sup>+</sup> RNA を用いて作成したcDNAライブラリーから、OCIFcDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーション法により得られるOCIF類縁体のcDNAを発現ベクターに挿入し、そのベクターを通常用いられ

る宿主に組み込み、宿主で発現させ、常法により精製することにより得られるもの等が挙げられる。より具体的には、W096/26217号公報に記載されたOCIF2、OCIF3、OCIF4、またはOCIF5が挙げられる。

これらは、W096/26217号公報に記載されるように、OCIF2は、OCIFcDNAの塩基配列の265番目のグアニンから285番目のグアニンまでの21bpの欠失があり、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の68番目のグルタミン酸(Glu)から74番目のグルタミン(Gln)までの7アミノ酸の欠失があるものである。

OCIF3は、OCIFcDNAの塩基配列の9番目のシチジンがグアニンに変換されていて、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。ただし、この点は、シグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF3には影響しないと思われる。さらに、OCIFcDNAの塩基配列の872番目のグアニンから988番目のグアニンまでの117bpの欠失があり、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の270番目のスレオニン(Thr)から308番目のロイシン(Leu)までの39アミノ酸の欠失がある。

OCIF4は、OCIFcDNAの塩基配列の9番目のシチジンがグアニンに変換されていて、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。又、22番目のグアニンがチミジンに変換されていて、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の-14番目のアラニン(Ala)がセリン(Ser)に変わっている。ただし、これらはシグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF4には影響しないと思われる。さらにOCIFcDNAの塩基配列の400番目と401番目の間に約4kbのイントロン2の挿入があり、オープンリーリングフレームがその中で止まる。アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の112番目のアラニン(Ala)の後に21アミノ酸からなる新規なアミノ酸配列が付加されているものである。

OCIF5は、OCIFcDNAの塩基配列の9番目のシチジンがグアニンに変換されてい

て、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。ただし、これはシグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF5には影響しないと思われる。さらに、OCIFcDNAの塩基配列の400番目と401番目の間に約1.8 kbのイントロン2の後半部分の挿入があり、オープンリーリングフレームがその中で止まっている。アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列の112番目のアラニン(Ala)の後に12アミノ酸からなる新規なアミノ酸配列が付加されているものである。

変異体としては、OCIFのアミノ酸配列に対し1以上のアミノ酸が挿入、付加、置換、あるいは欠失されたものが挙げられる。より具体的には、OCIFcDNAにPCR法あるいは制限酵素による切断により置換あるいは欠失変異を入れたOCIF変異体cDNAを作成し、このcDNAを発現ベクターに挿入し、そのベクターを通常用いられる宿主に組み込み、宿主で発現させ、常法により精製することにより得られるものが挙げられる。

本発明で用いる多糖類は、単糖がグリコシド結合によって生じた重合体（グルカン）であり、好ましくは構成单糖が2種以上からなるヘテロ多糖（ヘテログリカン）である。具体的には、天然多糖類として例えばヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、カラギーナン、ペクチンまたはヘパリンなど、あるいは合成多糖類としては例えばデキストランなど、また、合成多糖類の誘導体としては例えばデキストラン硫酸などが用いられる。特に好ましくはグルカンが硫酸エステル化されたものが用いられ、例えばヘパリンの分子量3,000～6,000のものあるいはデキストラン硫酸の分子量5,000～10,000のものが用いられる。本発明の骨代謝異常症治療剤は、OCIF、その類縁体、またはその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類またはその誘導体を、多糖類またはその類縁体がOCIF、その類縁体、またはその変異体に対し1～100倍量、特に1～16倍量の割合で組み合わせるのが好ましい。OC

IF、その類縁体、またはその変異体からなる群から選択される一以上の物質と多糖類またはその誘導体とを組み合わせた本発明製剤は、OCIF単独投与に比べて持続性と治療効果が優れた骨代謝異常症治療剤として、例えば骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して有効である。

本発明の製剤は、ヒトあるいは動物に対し、医薬として経口的及び非経口的に安全に投与される。非経口的投与としては、例えば静脈注射、筋肉内注射、皮下注射、経鼻投与、口腔内投与、経粘膜投与等が挙げられる。これらの投与経路で投与するための製剤は公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、滑沢剤、着色剤等と共に医薬品組成物として投与される。注射剤を調製する場合は、OCIF及び多糖類の他に、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加して、常法により注射剤とする。その際、ヒト血清アルブミンや界面活性剤等の公知の添加剤を併用してもよい。界面活性剤としては、例えばポリアニオニン類や陰イオン性界面活性剤等が挙げられる。注射剤はバイアル瓶に分注し溶液製剤にするか、あるいは凍結乾燥製剤として、用時に適時蒸留水や生理的食塩水等に溶解することによって調製することができる。OCIFを3または24mg/kg・dayの用量で正常ラットに1日1回2週間連続静脈内投与したところ、骨密度と骨量の増大が確認されたが、38組織における組織病理学的な異常や血球数の変動等は観察されなかった(H. Yasuda et al.: *Endocrinology*, Vol. 139, pp1329-1337(1998))。このように、OCIFの作用は骨に特異性が高く、安全にヒトに投与できることが期待される。

本発明の骨代謝異常症治療剤を患者に投与する場合の投与量と投与方法は、症状の程度、患者の年齢、健康状態、体重などの条件によって異なるので特に限定されないが、例えば成人1日当たり約0.01~1mg/kgを非経口的に1日1~数回投与すれば良い。また、本発明製剤の活性は、血清カルシウムの濃度を測定することにより行うことができる。例えば、適当な溶媒を用いて調製したOCIF溶液に多

糖類を添加したものをラットに静脈内投与し、経時的に採血を行いその血清カルシウム濃度を常法により測定することにより行うことができる。

また、本発明は、多糖類またはその誘導体を用いて破骨細胞形成抑制因子の活性を高める方法に関する。本発明によると、OCIFの血中濃度を高め、OCIFの血清カルシウム濃度低下作用を増強することができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、実施例2における、OCIFに多糖類を添加した製剤の、投与3時間後の血清カルシウム濃度を示す。

##### [符号の説明]

D-1 : OCIF 0.5mg/kg + デキストラン硫酸 (分子量 5,000) 2mg/kg

D-2 : OCIF 0.5mg/kg + デキストラン硫酸 (分子量 8,000) 2mg/kg

D-3 : OCIF 0.5mg/kg + デキストラン硫酸 (分子量 10,000) 2mg/kg

H-1 : OCIF 0.5mg/kg + ヘパリン (207.8 units/mg) 2mg/kg

H-2 : OCIF 0.5mg/kg + ヘパリン (171.2 units/mg) 2mg/kg

H-3 : OCIF 0.5mg/kg + ヘパリン (分子量 3,000) 2mg/kg

H-4 : OCIF 0.5mg/kg + ヘパリン (分子量 6,000) 2mg/kg

\*\* : 危険率 1% 以下で有意差あり

第2図は、実施例3における、OCIFと多糖類の混合比を変えて投与した時の、投与3時間後の血清カルシウム濃度を示す。

##### [符号の説明]

\*\* : 危険率 1% 以下で有意差あり

第3図は、実施例4における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、投与3, 6, 9時間後のそれぞれの血清カルシウム濃度を示す。

##### [符号の説明]

\*\* : 危険率 1% 以下で有意差あり

第4図は、実施例5における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、経時的な血中OCIF濃度の変化を示す。

[符号の説明]

A : ダイマー型OCIFの血中濃度を示す図。

B : モノマー型OCIFの血中濃度を示す図。

● : OCIF

○ : OCIF+デキストラン硫酸

第5図は、実施例5における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、モノマー型/ダイマー型OCIFの血中における割合の経時変化を示す。

[符号の説明]

A : OCIF

B : OCIF+デキストラン硫酸

○ : ダイマー型OCIF

△ : モノマー型OCIF

第6図は、実施例6における、OCIFに多糖類（デキストラン硫酸、リンゴペクチン又は甘皮類ペクチン）を添加した製剤の、投与後2及び4時間後の血中OCIF濃度を示す。

[符号の説明]

□ : 0.5mg/kg OCIF単独投与

◇ : 0.5mg/kg OCIF+0.5%デキストラン硫酸

○ : 0.5mg/kg OCIF+0.5%リンゴペクチン

△ : 0.5mg/kg OCIF+0.5%甘皮類ペクチン

第7図は、実施例6における、OCIFに多糖類（デキストラン硫酸、リンゴペクチン又はカラギーナン）を添加した製剤の、投与後2及び4時間後の血中OCIF濃度を示す。

## [符号の説明]

- : 0.5mg/kg OCIF単独投与
- ◇ : 0.5mg/kg OCIF+0.5%デキストラン硫酸
- : 0.5mg/kg OCIF+0.5%リンゴペクチン
- △ : 0.5mg/kg OCIF+0.5%カラギーナン（ラムダ）

第8図は、実施例7における、OCIFに多糖類（デキストラン硫酸又はリンゴペクチン）を添加した製剤の、静脈内投与後の血中OCIF濃度を示す。

## [符号の説明]

- : 50 μg/kg OCIF単独投与
- △ : 50 μg/kg OCIF+0.1%デキストラン硫酸
- : 50 μg/kg OCIF+0.15%リンゴペクチン

第9図は、実施例7における、OCIFに多糖類（デキストラン硫酸又はリンゴペクチン）を添加した製剤の、筋肉内投与後の血中OCIF濃度を示す。

## [符号の説明]

- : 1mg/kg OCIF単独投与
- △ : 1mg/kg OCIF+0.1%デキストラン硫酸
- : 1mg/kg OCIF+0.15%リンゴペクチン

第10図は、実施例8における、OCIFに多糖類（リンゴペクチン）を添加した製剤の、投与4時間後の血清カルシウム濃度を示す。

### 発明を実施するための最良の形態

## [実施例]

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、これらは単に具体的に例示したのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

## [実施例1]

#### 注射剤の製造・1

WO96/26217号公報記載の方法に従って得られたヒトOCIF 500  $\mu\text{g}$  及びヘパリン 2 mgを、0.15M NaCl及び0.01%Tween 80を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 5mlに溶解し、この溶液を0.22  $\mu\text{m}$  の滅菌フィルター (Milllex GV, ミリポア社) で滅菌した後、バイアル瓶に充填することにより静注用注射剤を得た。

#### 注射剤の製造・2

WO96/26217号公報記載の方法に従って得られたヒトOCIF 500  $\mu\text{g}$  及びデキストラン硫酸 2 mgを、0.15M NaCl及び0.01%Tween 80を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) 5mlで溶解し、この溶液を0.22  $\mu\text{m}$  の滅菌フィルター (Milllex G V, ミリポア社) で滅菌した後、バイアル瓶に充填することにより静注用注射剤を得た。

#### 〔実施例 2〕

##### 多糖類の添加によるOCIFの血清カルシウム濃度低下効果・1

ヒト OCIF(ダイマー型)(WO96/26217号公報記載の方法により得られた遺伝子組換型OCIF) を、0.15M NaCl及び0.01%Tween 80を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0) (以下、溶媒と称す) に溶解して調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2 mlに、デキストラン硫酸 (分子量8000または10000 : シグマ社、及び分子量5000または50000 : 和光純薬社) あるいはヘパリン (207.8 または 171.2 unit/mg : 和光純薬社、及び分子量3000または6000 : シグマ社) 2 mgを溶解した後、4 °Cで一昼夜放置した。同時にヒト型OCIF 0.25 及び2.5 mg/ml 溶液並びに溶媒についても、4 °Cで一昼夜放置した。これらの被験試料液を、それぞれOCIFとデキストラン硫酸投与群 (D群) 、OCIFとヘパリン投与群 (H群)(D群及びH群はOCIF量として0.5mg/kg投与) 、OCIF単独投与群 (OCIF量として0.5mg/kg及び5mg/kg投与) 、及び溶媒投与群として準備した。4 週齢の雌性ウィスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与した。投与 3 時間後に眼窩採血を行い血清を調製し、得られた血清中のカルシウム濃度をカルシウムCテスト (和光純薬社) を用いて

測定した。結果を第1図に示す。この結果、種々のデキストラン硫酸あるいはヘパリンを添加した0.5mg/kgヒトOCIF投与により、有意な血清カルシウム濃度低下作用の増強効果が認められた。従って、多糖類の添加により、ヒトOCIFの血清カルシウム濃度低下作用を増強できることが確認された。

### 〔実施例3〕

#### 多糖類の添加量によるOCIFの作用増強効果

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに、ヒトOCIFに対してデキストラン硫酸（分子量5000：和光純薬社）1, 2, 4, 8, 16倍重量を溶解した後、4℃で一昼夜放置した。同様に、ヘパリン(207.8 units/mg：和光純薬社)も同じ比率でヒト型OCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに溶解し、4℃で一昼夜放置した。

さらに、4mg/mlに調製したデキストラン硫酸またはヘパリン溶液、0.25及び2.5mg/mlに調製したヒトOCIF溶液、及び溶媒のみについても、同様に4℃で一昼夜放置した。これらの被験試料液を、4週齢の雌性ウィスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与3時間後に眼窩採血を行い、血清を調製した。得られた血清中のカルシウム濃度を、カルシウムCテスト（和光純薬社）を用いて測定した。なお、このキットは、キレート法（オルトクレゾールフタレンコンプレキソン(OCPC)法）に8-キノリノールを添加し、マグネシウムの影響を除き、特異性を高めたもので、アルカリ条件下でOCPCと結合して紫紅色を呈し、その吸光度を測定することにより、カルシウム濃度を測定できるものである。結果を第2図に示す。この結果、デキストラン硫酸を、ヒトOCIFに対し4倍量以上添加した場合に、有意な血清カルシウム濃度低下作用が認められた。また、ヘパリンを、ヒトOCIFに対し等量を添加した場合でも、有意な血清カルシウム濃度低下作用が認められた。従って、ヒトOCIFと多糖類を特定の割合で同時に投与することにより、OCIFの血清カルシウム濃度低下作用がさらに増強されることが確認された。

## 〔実施例4〕

多糖類の添加によるOCIFの持続性増強効果

溶媒で調製したヒトOCIF 2.5mg/ml 溶液 2mlに、デキストラン硫酸（分子量5000：和光純薬社）20mgを溶解した後、4℃で一昼夜放置した。ヘパリン(207.8 units/mg：和光純薬社) 20mgもヒトOCIF 2.5mg/ml 溶液 2mlに溶解し、同様に4℃で一昼夜放置した。さらに、2.5 mg/mlに調製したヒトOCIF溶液及び溶媒についても、4℃で一昼夜放置した。得られた被験試料液を、4週齢の雌性ウィスター系ラットにそれぞれ2ml/kg (OCIF量として5mg/kg) の用量で静脈内単回投与し、投与3, 6, 9 時間後に眼窩採血を行い、血清を調製した。得られた血清中のカルシウム濃度を、カルシウムCテスト（和光純薬社）を用いて測定した。結果を第3図に示す。この結果、5mg/kgヒトOCIF溶液単独投与群では、投与3時間後で有意な血清カルシウム濃度の低下は認められたものの、投与6及び9時間には血清カルシウム濃度低下作用は認められなかった。

一方、ヒトOCIFに対して4倍量のデキストラン硫酸またはヘパリンを添加した2.5 mg/ml ヒトOCIF溶液は、投与9時間後でも有意な血清カルシウム濃度低下作用を有することが認められた。従って、ヒトOCIFと多糖類を同時に投与することにより、持続性増強効果が得られることが確認された。

## 〔実施例5〕

多糖類の添加による血中OCIF濃度の持続効果・1

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 1 mg/ml 溶液 1mlにデキストラン硫酸4 mg/ml 溶液 1mlを加え、4℃で一昼夜放置した。この被験試料液を、9週齢の雄性ウィスター系ラットに1ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1440 分後に眼窩採血を行い血清を調製した。得られた血清中のヒトOCIF濃度を、ダイマー型OCIFを認識するモノクローナル抗体、モノマー型OCIFを認識するモノクローナル抗体(BIOCHEMICAL AND

BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp382-387(1998))を用いて、W096/26217号公報記載のELISA法により測定した。尚、全OCIF濃度は、ダイマー型OCIF濃度とモノマー型OCIF濃度の和として求めた。結果を第4図及び第5図に示す。この結果、500  $\mu$ g/kgヒトOCIF溶液単独投与群に比べて、ヒトOCIFに対して4倍量のデキストラン硫酸を添加したヒトOCIF溶液投与群は、明らかに高い血中OCIF濃度を維持した(第4図)。また、ダイマー型OCIFからモノマー型OCIFへの血中で変換が抑制されることが確認された(第5図)。従って、多糖類を添加することにより、OCIF血中濃度、特に血清カルシウム濃度低下活性の高いダイマー型OCIF(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 245, pp382-387(1998))の血中濃度が持続される。

#### 〔実施例6〕

##### 多糖類の添加による血中OCIF濃度の持続効果・2

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに、デキストラン硫酸、リンゴペクチン、又は甘皮類ペクチン(全て和光純薬社)の0.5%溶液(溶媒:0.15M NaCl, 0.01% ポリソルベート80含有 10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0))を等量混合し、室温にて4時間放置し、被験試料液を作製した。又、対照として0.25mg/ml OCIF溶液(2ml)のみについても、同様に溶媒を等量混合し室温にて4時間放置した。これらの被験試料液を、4週齢の雄性ウィスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与2及び4時間後にエーテル麻酔下で眼窩採血を行い血清を調製した。得られた血清中のヒト型OCIF濃度を、W096/26217号公報記載のELISA法を用いて測定した。結果を第6図に示す。

又、前述と同様の方法で、ヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに、デキストラン硫酸、リンゴペクチン、又はカラギーナン(ラムダ)(全て和光純薬社)の0.5%溶液を等量混合し、室温にて4時間放置し、被験試料液を調製した。又、対照として0.25mg/ml OCIF溶液のみについても、同様に溶媒を等量混合し室温にて4時間放

置した。これらの被験試料液を、4週齢の雄性ウィスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与2及び4時間後にエーテル麻酔下で眼窩採血を行い血清を調製した。得られた血清中のヒト型OCIF濃度を、W096/26217号公報記載のELISA法を用いて測定した。結果を第7図に示す。

これらの結果、ヒト型OCIF溶液単独投与群に比べて、デキストラン硫酸、リンゴペクチン、甘皮類ペクチンを添加したいずれの被験試料投与群でも、明らかに高い血中OCIF濃度を維持した（第6図）。また、カラギーナンを添加した被験試料投与群でも同様に、明らかに高い血中OCIF濃度を維持した（第7図）。よって、これらの多糖類を添加することにより、OCIFの血中濃度が持続されることが確認された。

#### 〔実施例7〕

##### 多糖類の添加による血中OCIF濃度の持続効果・3

多糖類としてデキストラン硫酸あるいはリンゴペクチン（和光純薬社）を用いて、投与経路の違いによる血中OCIFの持続効果を検討した。溶媒（0.15M NaCl、0.01% ポリソルベート80含有10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0））でヒトOCIFを静脈投与用は50μg/ml、筋肉内投用は1000μg/mlになるように希釈したOCIF溶液を準備し、これに上述の多糖類を加え、それぞれ被験試料液とした。この時、デキストラン硫酸は静脈投用あるいは筋肉内投用OCIF溶液に、それぞれ0.1%になるように添加した。又、リンゴペクチンは、溶媒に溶解して3mg/mlに調製した溶液を、2倍量の静脈投用あるいは筋肉内投用OCIF溶液（それぞれ100μg/ml及び2000μg/ml OCIF含有）に等量混合した。それぞれの溶液を4週齢の雄性ウィスター系ラットに1ml/kgの用量で単回投与した。投与後、静脈内投与は2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360分後に、筋肉内投与は30分、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24時間後に、それぞれエーテル麻酔下で眼窩採血を行い血清を調製した。得られた血清のヒト型OCIF濃度を、W096/26217号公報記載のELISA

法を用いて測定した。結果を第8図及び第9図に示す。

この結果、デキストラン硫酸あるいはリンゴペクチンを添加したOCIF溶液の、静脈内投与（第8図）あるいは筋肉内投与（第9図）において、明らかに高い血中OCIF濃度を維持した。よって、これらの多糖類を添加することにより、OCIFの血中濃度が持続されること、及び血中OCIF濃度の持続効果は投与経路にかかわらず観察されることが確認された。

#### 〔実施例8〕

##### 多糖類の添加によるOCIFの血清カルシウム濃度低下効果・2

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに対して、リンゴペクチン（和光純薬社）の0.5%溶液（溶媒：0.15M NaCl, 0.01%ポリソルベート含有 10mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0））を等量混合し、室温にて4時間放置し、被験試料液を調製した。同時に、OCIF溶液（ヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2ml）に溶媒を等量混合したもの、及び溶媒のみを用意した。それぞれの被験試料液を、4週齢の雄性ウィスター系ラットに2ml/kgの割合で静脈内単回投与した。投与4時間後にエーテル麻酔下で眼窩採血を行い血清を調製し、得られた血清中のカルシウム濃度をカルシウムCテスト（和光純薬社）を用いて測定した。結果を第10図に示す。この結果、0.5mg/kgヒト型OCIF溶液単独投与群では血清カルシウム濃度低下作用は認められなかったが、リンゴペクチンを添加した0.5mg/kgヒト型OCIF投与群では、有意な血清カルシウム濃度低下作用が認められた。従って、多糖類の添加により、ヒト型OCIFの血清カルシウム濃度低下作用を増強できることが確認された。

##### 産業上の利用可能性

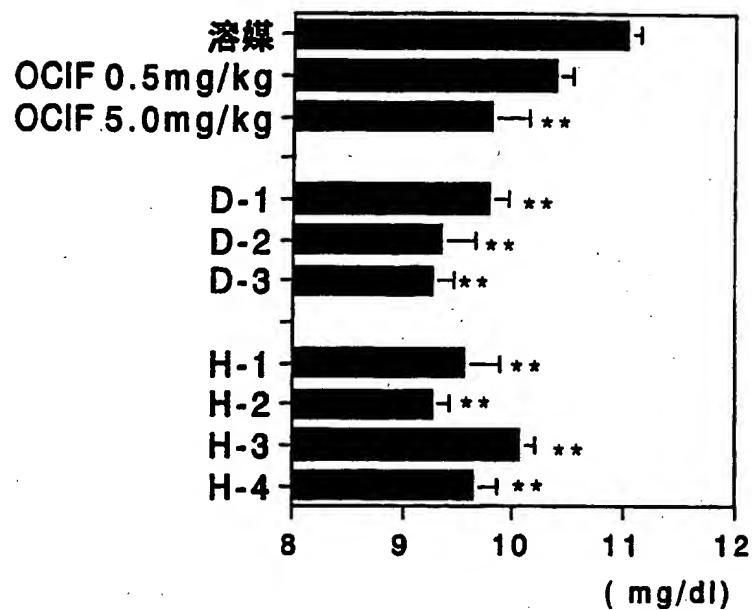
本発明により、破骨細胞形成抑制因子、その類縁体、またはその変異体から選択される一以上の物質、及び多糖類またはその誘導体からなる骨代謝異常症治療剤が提供される。本発明により、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマ

チ等の骨代謝疾患に対して優れた治療効果を有し、その活性を長時間維持できる骨代謝異常症治療剤が提供され、医薬として有用である。

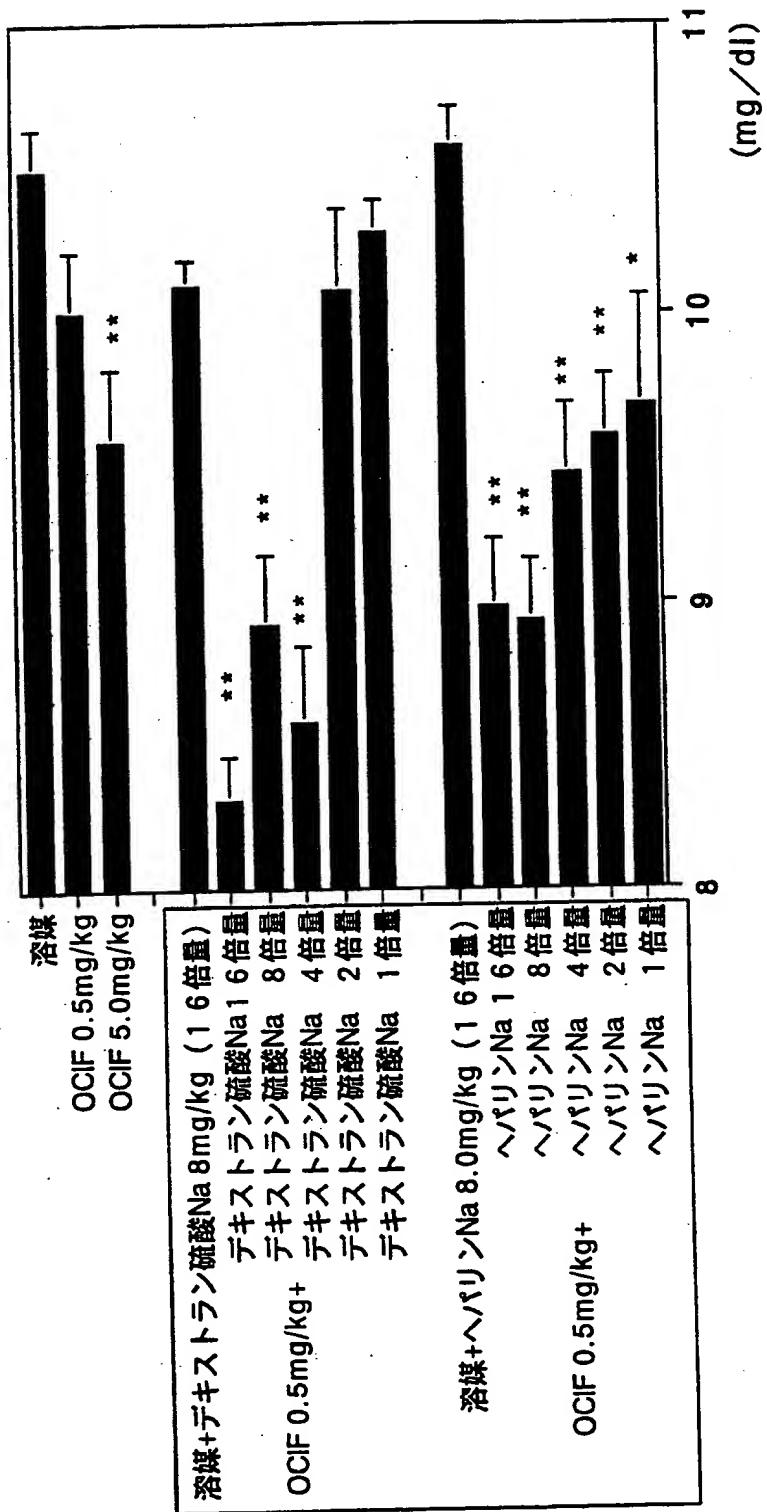
## 請求の範囲

- (1) 破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF) 、その類縁体、またはその変異体からなる群から選択される一以上の物質と多糖類またはその誘導体とからなる骨代謝異常症治療剤。
- (2) OCIFがヒトOCIFである請求の範囲 1 記載の骨代謝異常症治療剤。
- (3) 多糖類がヘパリン、ペクチン、及び／またはカラギーナンである請求の範囲 1 記載の骨代謝異常症治療剤。
- (4) 多糖類誘導体がデキストラン硫酸である請求の範囲 1 記載の骨代謝異常症治療剤。
- (5) 多糖類またはその誘導体を用いて破骨細胞形成抑制因子の活性化を高める方法。

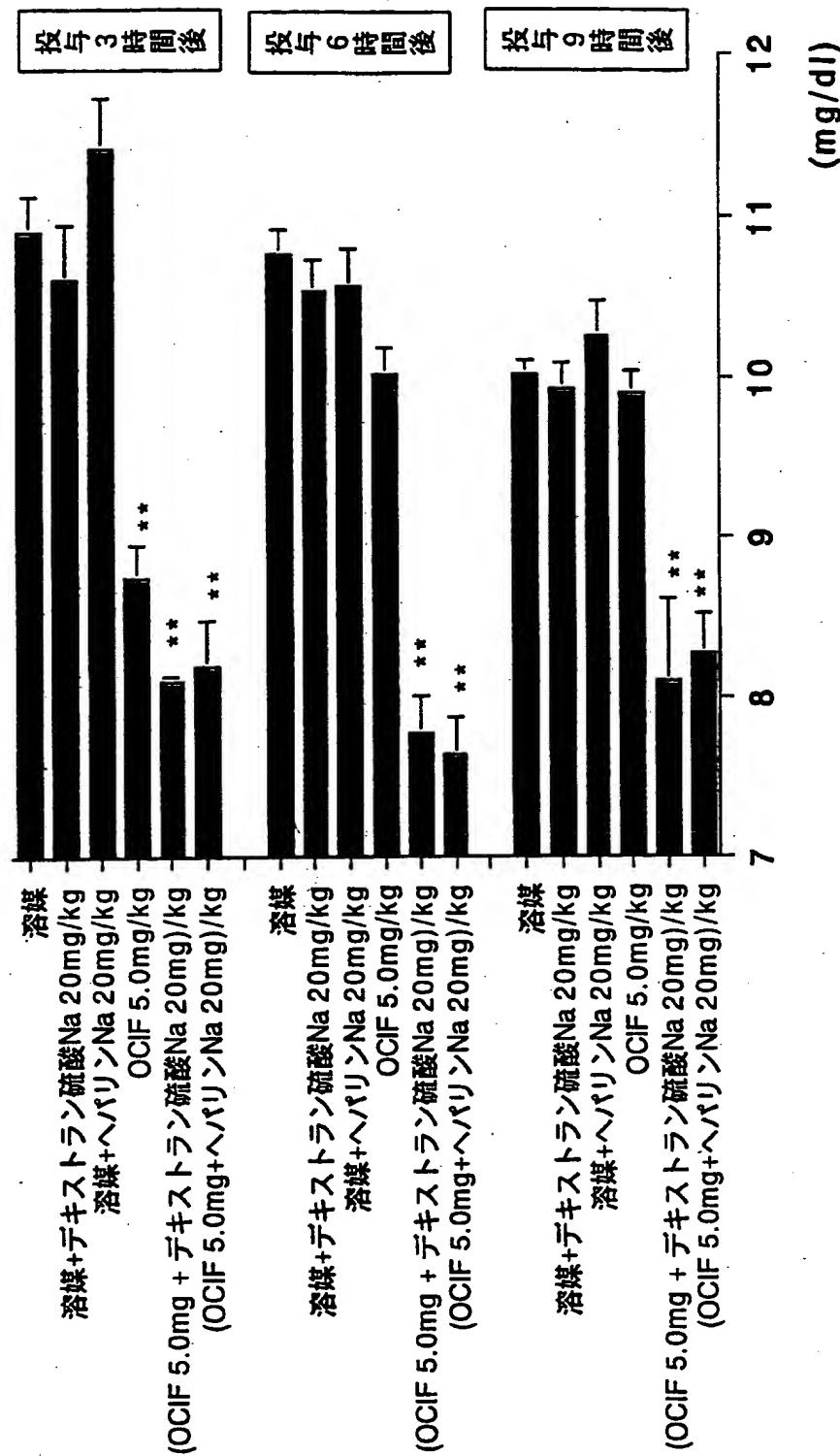
第1図



## 第2図



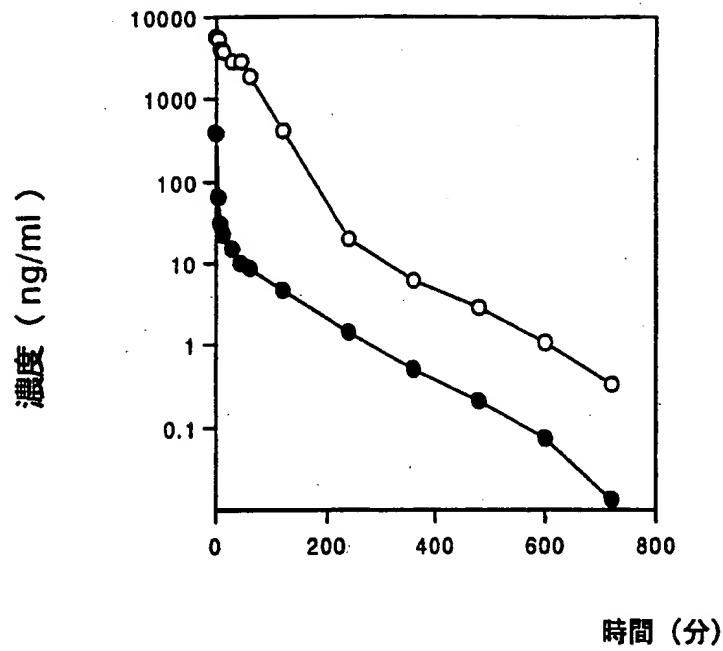
第3図



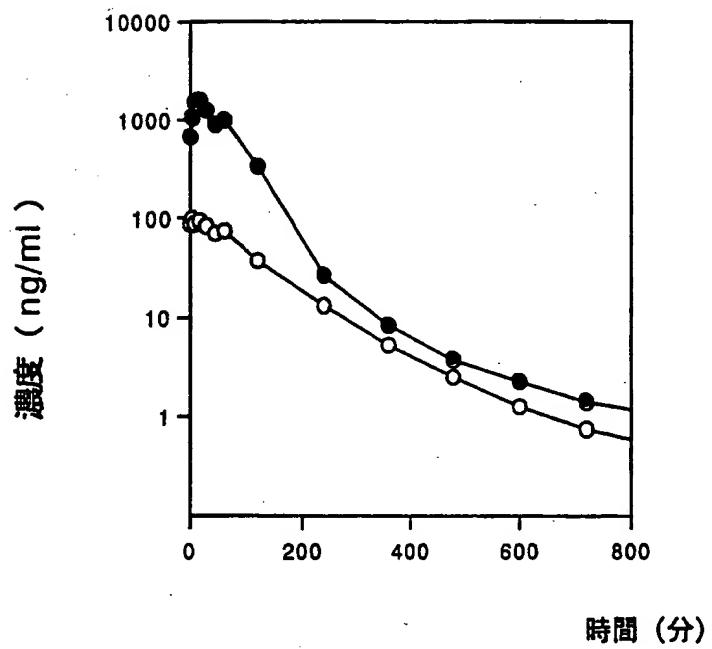
4/8

第4図

A

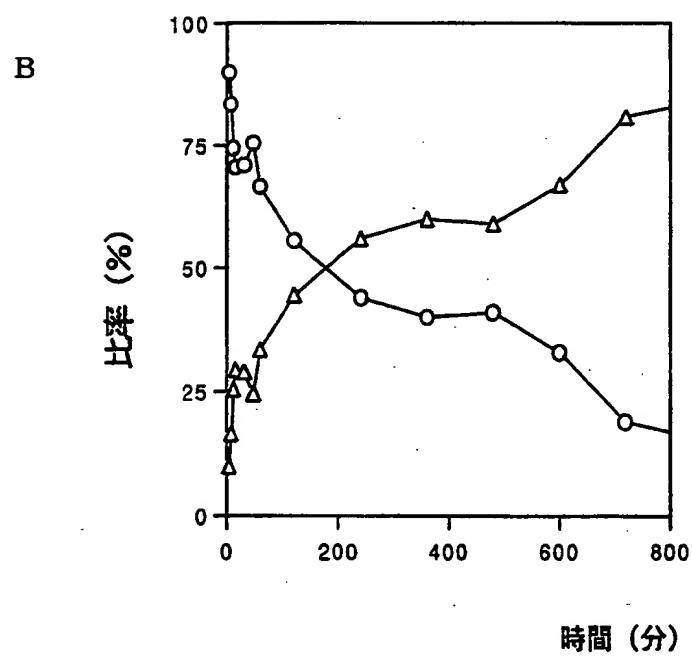
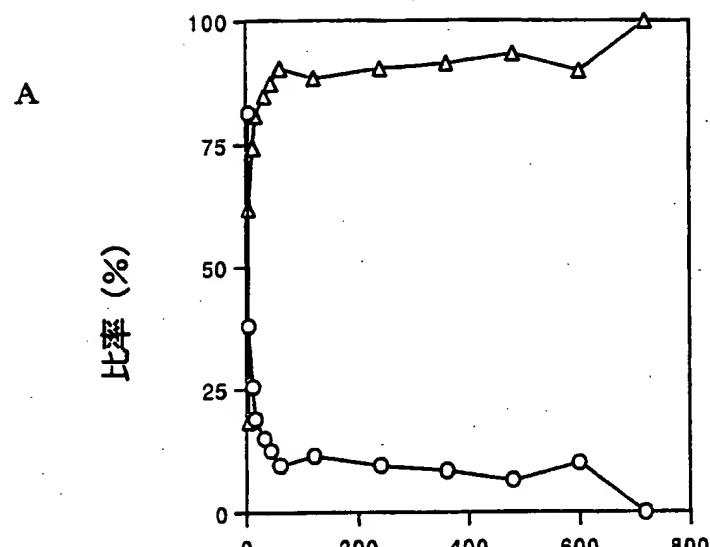


B



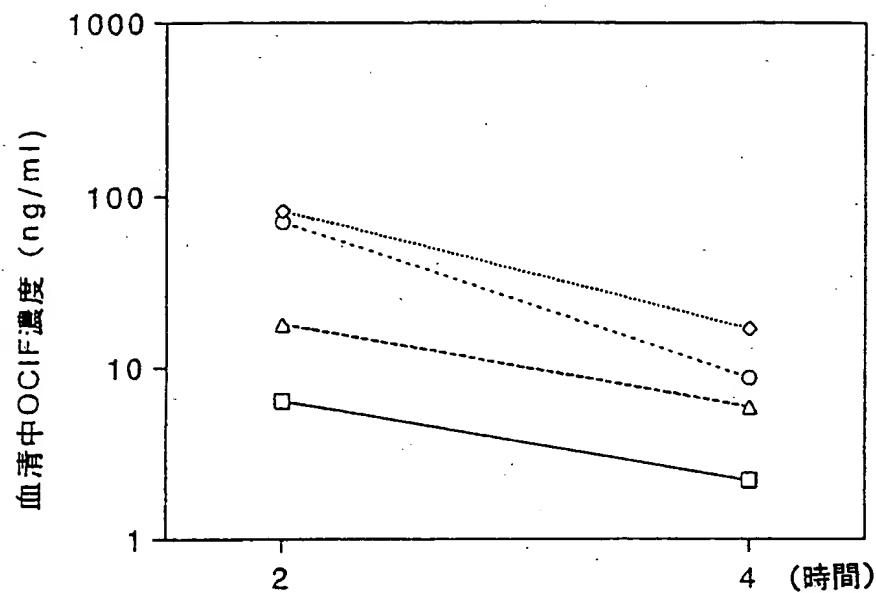
5/8

第5図

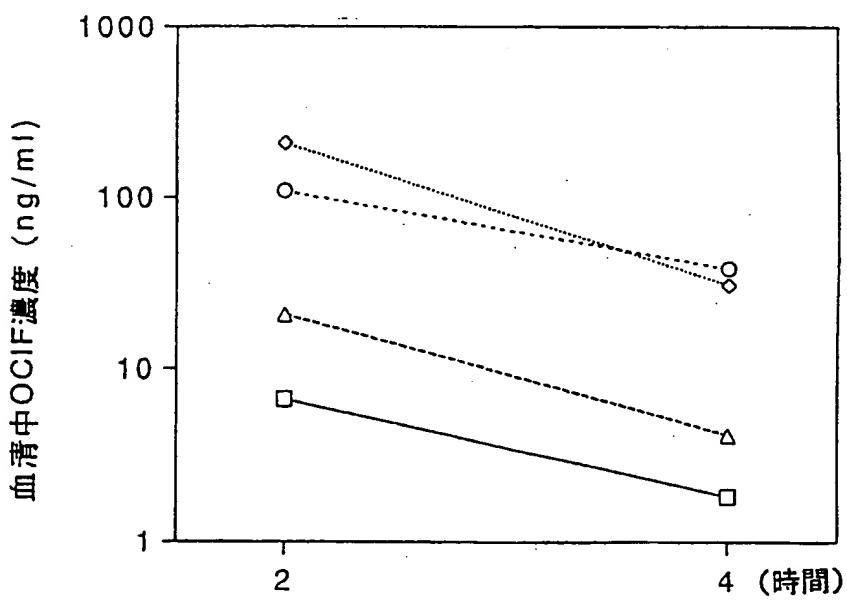


6/8

第6図

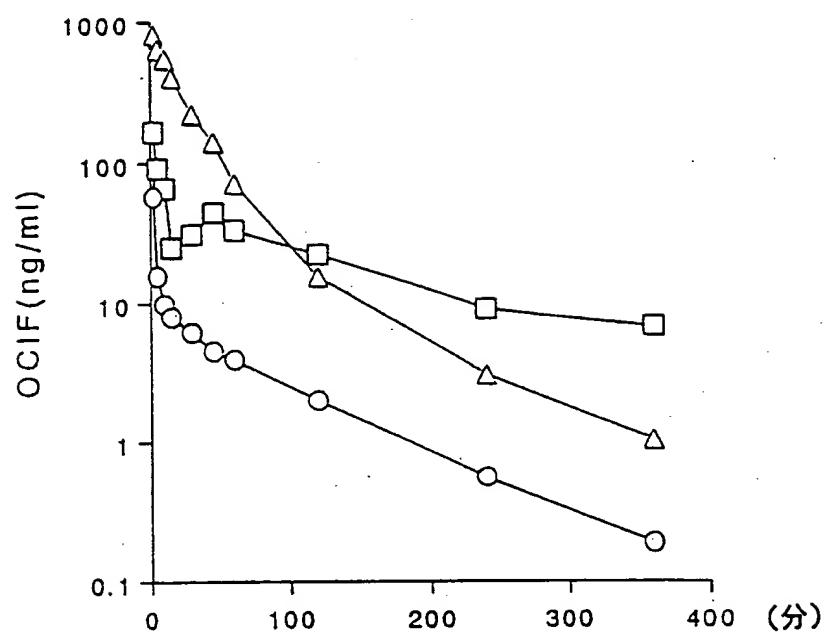


第7図

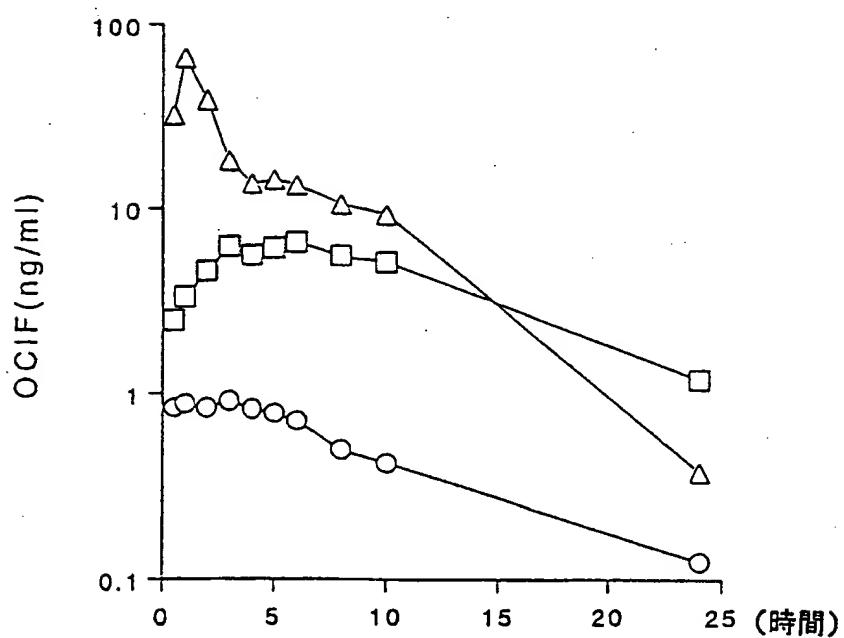


7/8

第8図

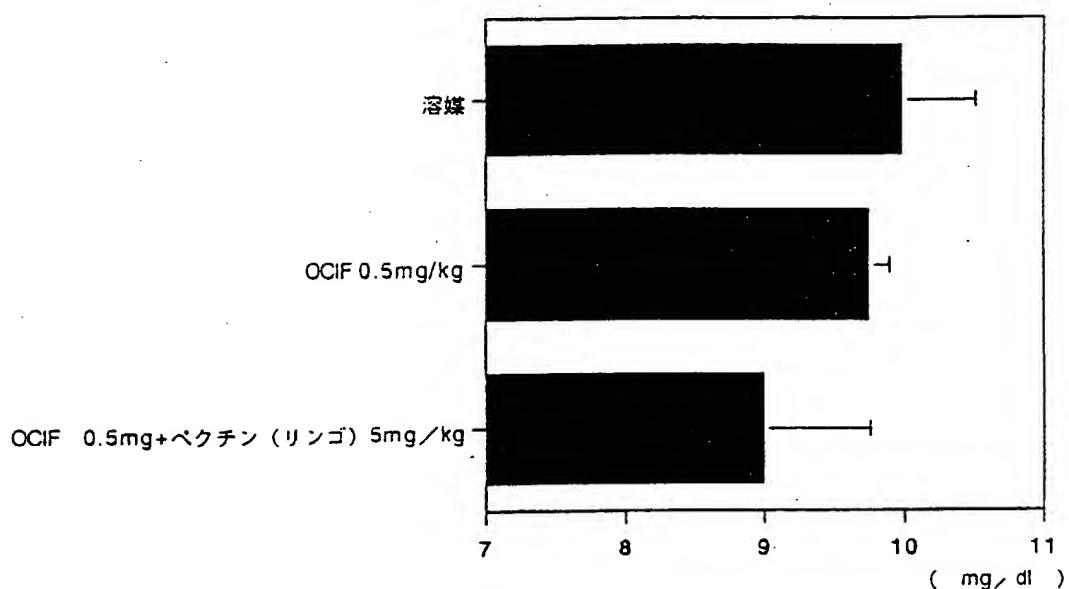


第9図



8/8

第10図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05963

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 47/36, A61P19/08, 3/00//C07K14/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/19, 47/36, A61P19/08, 3/00//C07K14/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD), 07 January, 1998 (07.01.98) & WO, 96/26217, A1	1-4
A	WO, 98/46211, A1 (AMGEN INC.), 22 October, 1998 (22.10.98) (Family: none)	1-4
A	TOMOYASU, Akihiro et al., "Characterization of Monomeric and Homodimeric Form of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, April 1998, Vol. 245, No. 2, pp.382-387	1-4
A	YAMAMOTO, Michiko et al., "Hypocalcemic Effect of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin in the Thyroparathyroidectomized Rat", Endocrinology, September 1998, Vol. 139, No. 9, pp.4012-4015	1-4
A	CHOWDHURY, Majedul H. et al, effects of Heparin on OsteoclastActivity, JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 1992, Vol.7, No.7, pp.771-776	1-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A" Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
04 January, 2000 (04.01.00)Date of mailing of the international search report  
11 January, 2000 (11.01.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05963

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COCHRAN, D. L. et al., "Modulation of Bone Resorption by Glycosaminoglycans:Effects of Parathyroid Hormone and Interleukin-1, Bone, 1988, Vol. 9, No. 5, pp.331-5	1-4
A	JP, 62-201825, A (LION CORPORATION), 05 September, 1987 (05.09.87) (Family: none)	1-4
A	Chem. abstr., Vol. 123, No. 18, 30 October 1995 (Columbus, OH, USA), page 662, column 2, the Abstract No. 237583p & IL, 91438, A1	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP99/05963

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 5  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 5 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K38/19, 47/36, A61P19/08, 3/00//C07K14/52

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' A61K38/19, 47/36, A61P19/08, 3/00//C07K14/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD) 07. 1月. 1998 (07. 01. 98) &WO, 96/26217, A1	1-4
A	WO, 98/46211, A1 (AMGEN INC.) 22. 10月. 1998 (22. 10. 98) ファミリーなし	1-4
A	TOMOYASU, Akihiro et al, Characterization of Monomeric and Homodimeric Form of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, April 1998, Vol. 245, No. 2, pp. 382-387	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

04. 01. 00

## 国際調査報告の発送日

11.01.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官 (権限のある職員)

渡邉 下 智告

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	YAMAMOTO, Michiko et al, Hypocalcemic Effect of Osteoclastogenesis Inhibitory Factor/Osteoprotegerin in the Thyroparathyroidectomized Rat, Endocrinology, September 1998, Vol. 139, No. 9, pp. 4012-4015	1-4
A	CHOWDHURY, Majeedul H. et al, effects of Heparin on Osteoclast Activity, JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 1992, Vol. 7, No. 7, pp. 771-776	1-4
A	COCHRAN, D. L. et al, Modulation of Bone Resorption by Glycosaminoglycans:Effects of Parathyroid Hormone and Interleukin-1, Bone, 1988, Vol. 9, No. 5, pp. 331-5	1-4
A	J P, 62-201825, A (ライオン株式会社) 05. 9月. 1987 (05. 09. 87) ファミリーなし	1-4
A	Chem. abstr., Vol. 123, No. 18, 30 October 1995(Columbus, OH, USA), page 662, column 2, the abstract No. 237583p & I L, 91438, A 1	1-4

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲5は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。